

**Caracterización y mejoramiento genético de dos especies silvestres de arándano de
Costa Rica (*Vaccinium consanguineum* y *V. poasanum*).**

Rebeca de los Ángeles Soto Valverde

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN INGENIERIA
AGRONOMICA CON ENFASIS EN FITOTECNIA**

**ESCUELA DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**

2015

**Caracterización y mejoramiento genético de dos especies silvestres de arándano de
Costa Rica (*Vaccinium consanguineum* y *V. poasanum*).**

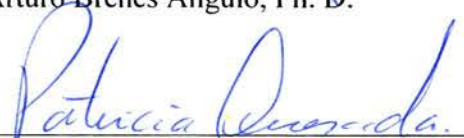
Rebeca de los Ángeles Soto Valverde

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN INGENIERIA
AGRONOMICA CON ENFASIS EN FITOTECNIA**



Arturo Brenes Angulo, Ph. D.

DIRECTOR DE TESIS



Patricia Quesada Rojas, M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



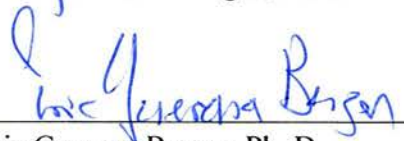
Eric Mora Newcomer, M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Pablo Bolaños Villegas, Ph. D.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Eric Guevara Berger, Ph. D.

DIRECTOR DE ESCUELA



Rebeca de los Ángeles Soto Valverde

SUSTENTANTE

DEDICATORIA

A Dios quien es el eje de mi vida, quien me sostiene y quien me ha permitido cumplir un logro más.

A mis padres Roberto Soto Herrera y Claudina Valverde Abarca, por su apoyo incondicional, su formación y ser mi ejemplo a seguir.

A mi novio Bach. Marco Esquivel Solano, por estar siempre a mi lado y brindarme su apoyo y consejos para alcanzar esta meta.

Gracias por formar parte fundamental de mi vida y por su ayuda para alcanzar este gran logro.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por concederme realizar y finalizar con éxito el presente trabajo final de graduación.

A mis padres Roberto Soto Herrera y Claudina Valverde Abarca por su apoyo incondicional durante toda mi formación como profesional.

Al Dr. Arturo Brenes-Angulo, director de tesis, por su confianza, apoyo, consejos y enseñanzas tanto en lo profesional como en lo personal durante toda la carrera, pero sobre todo en la realización de este estudio.

A la M.Sc. Patricia Quesada Rojas, al M.Sc. Eric Mora Newcomer y al Dr. Pablo Bolaños Villegas, miembros del Tribunal del Trabajo Final de Graduación, por su apoyo, consejos y recomendaciones brindadas durante la ejecución de este trabajo.

Al Dr. Luis Gómez- Alpizar por sus consejos, apoyo y recomendaciones brindadas durante el desarrollo de esta investigación y a lo largo de mi formación como profesional.

Al Dr. Alfonso García por sus consejos y apoyo para la realización e interpretación de los análisis en citometría de flujo.

Al Sr. Geovanny Quirós por su ayuda con la recolecta y evaluación de accesiones de las especies silvestres de arándano contempladas en este estudio.

A mis colegas y compañeros, Bach. Marco Esquivel, Lic. Laura Miranda, Lic. Rolbin Castillo, Mario Jiménez, Fernando Badilla, Carlos Huertas y Lic. Manuel Camacho por sus aportes, recomendaciones y apoyo.

A la Vicerrectoría de Investigación por el aporte financiero otorgado para realizar parte de este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	ix
RESUMEN.....	x
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	8
Objetivo General.....	8
Objetivos específicos	8
GENERALIDADES DEL CULTIVO	9
Origen y distribución	9
Caracterización morfológica	10
Clasificación taxonómica.....	11
Mejoramiento genético en <i>Vaccinium</i>	12
Uso de agentes antimitóticos.....	13
Citometría de flujo en plantas	16
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Material vegetal.....	18
Caracterización <i>in situ</i> y <i>ex situ</i> de las accesiones recolectadas	18
Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>V. consanguineum</i> y <i>V. poasanum</i> a partir de semillas	20
Desinfección de las semillas	21
Germinación <i>in vitro</i> de las semillas de <i>V. consanguineum</i> y <i>V. poasanum</i>	21
Efecto de dos agentes antimitóticos sobre el nivel de ploidía de <i>V. consanguineum</i> y <i>V. poasanum</i>	22

Análisis de citometría de flujo	24
RESULTADOS.....	27
Identificación de especies	27
Caracterización morfológica <i>in situ</i> de accesiones de arándano silvestre.....	27
Datos pasaporte	27
Accesiones de <i>V. consanguineum</i>	28
Accesiones de <i>V. poasanum</i>	33
Descriptores cuantitativos.....	35
Descriptores cualitativos.....	39
Análisis de correlación.....	40
Caracterización morfológica <i>ex situ</i> de accesiones de arándano silvestre	42
Descriptores cuantitativos.....	44
Descriptores cualitativos	45
Germinación de semillas.....	46
Efecto de agentes antimutógenos sobre dos especies de arándano silvestre de Costa Rica	50
DISCUSIÓN	58
Identificación de las especies de arándano silvestre	58
Caracterización morfológica.....	60
Caracterización morfológica <i>in situ</i>	60
Análisis de correlación.....	62
Caracterización morfológica <i>ex situ</i>	63
Germinación de semillas.....	64
Efecto de agentes antimutógenos sobre el nivel de ploidía de dos especies de arándano silvestre de Costa Rica	68
CONCLUSIONES	73
RECOMENDACIONES.....	74
LITERATURA CITADA	75
ANEXOS	88

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del arándano.....	11
Cuadro 2. Descriptores cuantitativos de accesiones de la especie <i>V. consanguineum</i> evaluados <i>in situ</i>	37
Cuadro 3. Descriptores cuantitativos de accesiones de la especie <i>V. poasanum</i> evaluados <i>in situ</i>	38
Cuadro 4. Correlación de descriptores cuantitativos evaluados <i>in situ</i> para la especie <i>V. consanguineum</i>	41
Cuadro 5. Correlación de descriptores cuantitativos evaluados <i>in situ</i> para la especie <i>V. poasanum</i>	41
Cuadro 6. Accesiones de <i>V. consanguineum</i> y <i>V. poasanum</i> establecidas en la Subestación de Fraijanes de Alajuela.....	43
Cuadro 7. Datos promedio de los descriptores cuantitativos evaluados <i>ex situ</i> de accesiones de la especie <i>V. consanguineum</i>	44
Cuadro 8. Datos promedio de los descriptores cuantitativos evaluados <i>ex situ</i> de una accesión (12 plantas) de la especie <i>V. poasanum</i>	45
Cuadro 9. Porcentajes de germinación y plántulas establecidas <i>in vitro</i> de dos especies de arándano silvestre cuyas semillas fueron embebidas en soluciones de diferentes concentraciones de GA ₃	47
Cuadro 10. Número de diploides, mixoploides y tetraploides obtenidos en <i>V. consanguineum</i> (A007 y A015) y <i>V. poasanum</i> (A020 y A023) con la aplicación de distintas concentraciones de colchicina y orizalina en diferentes tiempos de exposición.....	51
Cuadro 11. Número de explantes diploides, mixoploides y tetraploides inducidos con diferentes concentraciones y tiempos de exposición a colchicina en dos accesiones de <i>V. consanguineum</i> (A007 y A015).....	53
Cuadro 12. Número de diploides, mixoploides y tetraploides inducidos con distintas concentraciones y tiempos de exposición de orizalina en dos accesiones de <i>V. consanguineum</i> (A007 y A015).....	55

Cuadro 13. Análisis de modelos mixtos mediante el programa SAS Studio para el porcentaje de supervivencia en explantes tratados con dos agentes antimicrobianos a tres tiempos de exposición y en dos accesiones de *V. consanguineum*.....57

Cuadro 14. Tratamientos con dos agentes antimicrobianos a tres tiempos de exposición y para dos accesiones de *V. consanguineum* que resultaron significativamente diferentes entre sí con el análisis de modelos mixtos mediante el programa SAS Studio ($\alpha = 5\%$).....57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Puntos de colecta de accesiones de dos especies de arándano silvestre de Costa Rica (<i>V. consanguineum</i> y <i>V. poasanum</i>).....	19
Figura 2. Descriptores cualitativos para dos especies de arándano silvestre de Costa Rica (<i>V. consanguineum</i> y <i>V. poasanum</i>).....	39
Figura 3. Plantas de <i>V. consanguineum</i> (a) y <i>V. poasanum</i> (b) luego de 6 meses de establecidas en la Subestación de Fraijanes de Alajuela.	46
Figura 4. Estadios en la germinación de semillas y crecimiento de plantas establecidas <i>in vitro</i> de <i>V. consanguineum</i>	48
Figura 5. Estadios en la germinación y crecimiento de vitroplantas de <i>V. poasanum</i>	49

ÍNDICE DE ANEXOS

Figura 6. Análisis de citometría de flujo de una muestra diploide de arándano silvestre de Costa Rica.....	88
Figura 7. Resultados de análisis de citometría de flujo de una muestra mixoploide de arándano silvestre de Costa Rica.....	89
Figura 8. Resultados de análisis de citometría de flujo de una muestra tetraploide de arándano silvestre de Costa Rica.....	90
Figura 9. Apariencia de vitroplantas de accesiones de dos especies de arándano silvestre <i>V. consanguineum</i> (A007 y A015) y <i>V. poasanum</i> (A020) tratadas con dos agentes antimitóticos.....	91
Figura 10. Apariencia de vitroplantas de la accesión A007 tratadas con distintas concentraciones de colchicina a tres tiempos de exposición.....	92
Figura 11. Apariencia de vitroplantas de la accesión A015 tratadas con distintas concentraciones de colchicina a tres tiempos de exposición.....	93
Figura 12. Apariencia de vitroplantas de la accesión A007 tratadas con distintas concentraciones de orizalina a tres tiempos de exposición.....	94
Figura 13. Apariencia de vitroplantas de la accesión A015 tratadas con distintas concentraciones de orizalina a tres tiempos de exposición.....	95

RESUMEN

Se efectuó una caracterización morfológica *in situ* y *ex situ* de accesiones de dos especies silvestres de arándano de Costa Rica (*Vaccinium consanguineum* y *V. poasanum*), y se estableció una colección de estas accesiones en la Subestación de Fraijanes, de la Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno. Posteriormente, se evaluó el efecto de dos agentes antimitóticos sobre ambas especies.

Las accesiones se recolectaron en tres provincias del país: Alajuela, San José y Cartago. Se recolectaron frutos maduros y de 3 a 5 arbustos menores a 1,5 m de altura por población encontrada. En cada sitio de colecta se evaluó 11 descriptores cuantitativos y 6 cualitativos. Para las accesiones establecidas en la subestación de Fraijanes se evaluó 6 descriptores cuantitativos y 3 cualitativos. Los caracteres cualitativos no presentaron variabilidad entre accesiones de cada especie, por lo que se pueden descartar para futuras evaluaciones. En la colección *ex situ* se logró establecer al menos 3 arbustos de cada una de las 8 accesiones de la especie *V. consanguineum* recolectadas y 12 arbustos de una accesión de *V. poasanum*.

Para evaluar el efecto de los agentes antimitóticos, brotes de plántulas establecidas *in vitro*, a partir de semillas de frutos maduros de varias accesiones, fueron inoculados en medio de cultivo con diferentes concentraciones de colchicina y orizalina (50, 100 y 150 mg/L) y a diferentes tiempos de exposición (24, 48 y 96 horas). Para homogenizar la germinación *in vitro* de las semillas, estas fueron tratadas con distintas concentraciones de ácido giberélico. Para cada tratamiento con los agentes antimitóticos se determinó el efecto sobre la ploidía

por medio de citometría de flujo. Se observó que a las concentraciones y tiempos de exposición utilizados, la colchicina no fue efectiva para inducir la duplicación cromosómica. Sin embargo, varios de los tratamientos con orizalina indujeron la formación de tetraploides en la especie *V. consanguineum*. A la especie *V. poasanum* no se le pudo aplicar todos los tratamientos con los agentes antimitóticos debido a la escasez de semilla y la dificultad para inducir la germinación de la misma; sin embargo en las pruebas preliminares si se obtuvo duplicación cromosómica con el uso de orizalina.

INTRODUCCIÓN

El arándano pertenece a la familia de las ericáceas y al género *Vaccinium*. Este género posee alrededor de 40 especies en el Neotrópico, desde México hasta el Norte de Argentina. A nivel mundial, existen entre 150 y 450 especies divididas en 30 secciones, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en el hemisferio Norte, Asia tropical, Centroamérica y América del Sur. Unas pocas especies, se encuentran en Madagascar, África y China. Los arándanos son plantas arbustivas, hierbas sufrutescentes, árboles o lianas terrestres o epífitas y sus flores se ubican en las axilas de las hojas o brácteas (Hammel *et al.* 2010).

Existen varias especies de arándano que son de interés comercial. La mayoría de éstas se encuentran en la sección Cyanococcus e incluyen cultivares de las especies *V. corymbosum* L. (arándano highbush), *V. ashei* Reade (arándano rabbiteye) y *V. angustifolium* Ait. (arándano lowbush). Otras especies también importantes son *V. macrocarpon* Ait. (arándano rojo), *V. myrtillus* L. (arándano bilberry), *V. membranaceum* Douglas (arándano tall bilberry), *V. deliciosum* Piper (arándano huckleberry) y *V. vitis-idaea* (arándano lingonberry) (Hancock *et al.* 2008, Finn *et al.* 2014).

El cultivo comercial de arándano inició en la década de los 60s en España y se ha incrementado en los últimos años debido a las propiedades nutricionales y agradable sabor de los frutos. Es una fruta muy apetecida en el mercado europeo y estadounidense y se comercializa como producto fresco o procesado en forma de mermeladas, licores, jugos, confituras y otros. De las variedades highbush, aproximadamente el 50% de la producción

se comercializa como producto fresco y el restante es procesado (Hancock *et al.* 2008; García y García 2011).

El arándano es un fruto no tradicional que se puede cultivar a gran escala. El cultivo requiere de una considerable inversión inicial pero genera un excelente retorno de inversión a largo plazo, lo cual lo convierte en una alternativa viable para la exportación (Forbes *et al.* 2009).

Actualmente, Estados Unidos y Chile son los mayores productores a nivel mundial. El primero posee más de 20 000 hectáreas sembradas con variedades de arándano tipo highbush, con un rendimiento de 110 000 t anuales de fruta, 3 000 ha de las variedades rabbiteye que producen 5500 t y 40 000 ha de las variedades Lowbush que generan entre 40 000 y 50 000 t por año. En total, para el año 2010 se produjeron 224 000 toneladas de fruta, lo que equivalió a \$644 millones. En Chile se cultivan aproximadamente 8500 hectáreas con cultivares highbush. Otros países que cultivan arándanos son Argentina, Australia, Nueva Zelanda, Canadá y el continente Europeo (Garces 2007; Hancock *et al.* 2008; Die y Rowland 2013).

El arándano ofrece un gran potencial comercial por sus aportes nutricionales. Su alto contenido de fibra ayuda a tratar el estreñimiento y la atonía intestinal. Posee bajo contenido calórico y es una buena fuente de calcio, potasio, hierro, taninos de acción astringente y varios ácidos orgánicos. Es además diurético, ayuda a bajar los niveles de azúcar en la sangre, mejora la percepción visual y reduce sustancias ligadas al Alzheimer. Este fruto es también abundante en pigmentos naturales como carotenoides y antocianos,

que poseen acción antioxidante. Se suman a estas características sus altos contenidos de vitamina C, por lo que fortalece el sistema inmunológico y ayuda a disminuir el riesgo de contraer enfermedades degenerativas y cardiovasculares (García y García 2011).

El arándano es una de las especies de más reciente domesticación. A finales del siglo XIX, se comenzaron los programas de selección y técnicas de propagación de estos arbustos. En los años 1900s, se inició el mejoramiento de las variedades highbush y en 1908 se obtuvo el primer híbrido. Paralelamente se comenzaron a estudiar técnicas de manejo del cultivo como podas, fertilización, requerimientos de pH del suelo y métodos de propagación entre otros (Hancock *et al.* 2008; Forbes *et al.* 2009).

Algunas de las técnicas de mejoramiento empleadas son la hibridación interespecífica, la selección, detección de marcadores moleculares para la distinción entre especies y cultivares, micropropagación (cultivo de tejidos) y uso de agentes antimutógenos entre otros (Prodanutti *et al.* 2007, Hancock *et al.* 2008).

Los agentes antimutógenos se utilizan en mejoramiento de los cultivos con el fin de producir diversos niveles de ploidía en las plantas. Esto con el propósito de aumentar el tamaño de órganos como los frutos, flores u otras estructuras de interés comercial, o para emplearlos en la realización de cruces entre especies que presentan propiedades o características deseables pero que difieren en su nivel de ploidía (Morejohn *et al.* 1987; Chalak y Legave 1996; Hansen y Andersen 1996; Henny *et al.* 2009; Huei *et al.* 2009; Rodrigues *et al.* 2011). Estos agentes deben ser fáciles de usar, útiles en un amplio número de especies,

eficientes y no deben generar problemas fisiológicos ni alteraciones genéticas (selección intrasomática, mutaciones genómicas y aneuploidías) (Pintos *et al.* 2014).

Existen cuatro productos químicos o agentes antimitóticos que se han utilizado para este fin: la Colchicina, la Orizalina, la Trifluralina y el Amiprofos- metilo (APM); la colchicina ha sido tradicionalmente la más utilizada. Esta es usada como un fármaco; mientras que los tres últimos son herbicidas. La orizalina y trifluralina son del grupo químico de las dinitroanilinas y el APM es un organofosforado (Morejohn *et al.* 1987; Chalak y Legave 1996; Hansen y Andersen 1996; Henny *et al.* 2009; Huei *et al.* 2009; Rodrigues *et al.* 2011).

El principio o modo de acción de los agentes antimitóticos es generar metafases detenidas. La colchicina interfiere con la estructura de las fibras del huso mitótico debido a que se une a la tubulina de los microtúbulos e inhibe su formación. La orizalina y trifluralina interrumpen la mitosis por medio de la inhibición de la formación de los microtúbulos al impedir de forma específica el ensamblaje de la tubulina. El Amiprofos metil (APM) provoca la desaparición de los microtúbulos al depolimerizarlos completamente. Como resultado del modo de acción de estas sustancias se forman células con un doble número de cromosomas en la mayoría de los casos (Pintos *et al.* 2014, Cubero 1999).

Otra herramienta de gran utilidad en el mejoramiento de los cultivos, es el uso de especies silvestres. La importancia de éstas en programadas de mejoramiento fue reconocida desde el siglo pasado. Las especies silvestres de muchos cultivos se han empleado para introducir resistencia a plagas y enfermedades, al frío o al calor, mejorar la calidad de frutos o a

incrementar el rendimiento, entre otros. En el cultivo del arándano, se ha logrado mejorar la firmeza, tamaño y color del fruto, reducir las cicatrices pediculares e incrementar el rendimiento por medio de la incorporación de genes de especies silvestres de *Vaccinium* (Hancock *et al.* 2008, Hajjar y Hodgkin 2007, Rodríguez *et al.* 2003, Contreras 2008, Kameswara *et al.* 2003, Spooner *et al.* 2014).

En Costa Rica existen más de 10 especies silvestres de arándano, las cuales se caracterizan por sus flores con estambres largos e isomorfos como la corola, pedicelos articulados con el cáliz, ovario ínfero con pocos a muchos óvulos en cada uno de los 4 (-10) lóculos, y frutos abayados (Hammel *et al.* 2010). Crecen en ambientes húmedos y fríos, por encima de los 1500 msnm y son polinizados principalmente por colibríes y abejas (Madriz 2005). De estas especies, *Vaccinium consanguineum*, *V. floribundum* y *V. poasanum*, son las que presentan frutos de mayor tamaño, los cuales oscilan entre 6 y 9 mm de diámetro. En el país, se ha reportado el uso de *V. consanguineum*, *V. floribundum* y *V. poasanum* en los alrededores de la Cordillera de Talamanca para la fabricación de mermeladas caseras y como producto fresco. Esta actividad no se realiza con fines comerciales aún (Madriz 2005; Madriz y Restrepo 2011).

El Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), ha georeferenciado más de 50 puntos de colecta en el país de *V. consanguineum* y *V. poasanum*, los cuales se concentran en la Cordillera de Talamanca y la Cordillera Volcánica Central. En el Herbario Nacional

también se cuenta con una colección de referencia de todas las especies de arándanos silvestres de Costa Rica (Sánchez 2012)¹.

En Costa Rica existe actualmente un gran interés por implementar el cultivo del arándano. Las especies silvestres que crecen en las zonas altas del país presentan un gran potencial de mejoramiento para su cultivo comercial ya que poseen frutos con buenas características organolépticas y resistencia a plagas y enfermedades. Los frutos de especies silvestres, al no estar mejorados genéticamente, tienden a poseer mayor cantidad de antioxidantes que los de variedades comerciales. La especie *V. consanguineum* presenta entre 439 y 455 mg/100g de muestra de polifenoles totales; mientras que las variedades tipo highbush no sobrepasan los 320mg/100g de muestra. Los polifenoles totales están fuertemente correlacionados con la capacidad antioxidante (CITA 2013, Ávila *et ál.* 2007, Forney *et al.* 2012, Skupieñ 2006).

V. consanguineum posee frutos con porcentajes superiores de fibra dietética (11%), ceniza (0.4%), carbohidratos totales (19%) y proteína (0.8%) y vitamina C entre 243 a 247 mg/100g de muestra. La concentración de sólidos solubles es aceptable ya que es de 12 °Brix, mientras que el porcentaje de humedad es inferior (77%) al de las variedades highbush que presentan entre un 80 y un 88%. Sin embargo, los frutos que producen son de menor tamaño que los de las variedades comerciales que pueden alcanzar hasta 18 mm de diámetro, según la especie y variedad empleada. Esto imposibilita en este momento su

¹Sánchez, J. 2012. Especies silvestres de arándanos. Comunicación personal. San José, CR, Museo Nacional.

comercialización y desestimula su siembra comercial por sus bajos rendimientos. (Contreras 2010, CITA 2013, Ávila *et al.* 2007, Skupień 2006).

En este estudio se llevó a cabo la georeferenciación, recolección y caracterización morfológica de accesiones de dos especies silvestres de arándano de Costa Rica, *Vaccinium consanguineum* y *V. poasanum*, las cuales fueron establecidas *in vitro* y tratadas con agentes antimicrobianos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar accesiones de dos especies de arándano silvestre de Costa Rica para utilizarlas en el mejoramiento genético de este cultivo.

Objetivos específicos

1. Establecer en la subestación Fraijanes de la Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno de la Universidad de Costa Rica, una colección de accesiones de dos especies de arándano silvestre, *V. consanguineum* y *V. poasanum*, previamente georeferenciadas y recolectadas en las zonas altas de las provincias de Alajuela, San José y Cartago.
2. Caracterizar morfológicamente *in situ* y *ex situ* las accesiones recolectadas de cada una de las dos especies *V. consanguineum* y *V. poasanum*.
3. Determinar el efecto de dos agentes antimitóticos, Colchicina y Orizalina, sobre la duplicación cromosómica de accesiones de *V. consanguineum* y *V. poasanum* establecidas *in vitro*.

GENERALIDADES DEL CULTIVO

Origen y distribución

La mayoría de las especies de arándano se ubican en laderas montañosas en la zona tropical. Aproximadamente el 40 % de las especies de *Vaccinium* se originaron en el Sureste de Asia, un 35% son especies nativas de América (25% de América del Norte y un 10% entre América Central y América del Sur) y el 25% restante se encuentra disperso en todo el planeta. Sin embargo, se cree que este grupo se originó en América del Sur (Hancock *et al.* 2008; Song y Hancock 2011).

Las especies de mayor importancia comercial se encuentran en las secciones *Cyanococcus*, *Oxycoccus*, *Vitis-Idaea*, *Myrtillus* y *Vaccinium*. En el siglo XX, se domesticaron tres tipos de frutos del género *Vaccinium*: el arándano azul o blueberry y dos especies de arándanos rojos: el cranberry y el lingonberry; el blueberry pertenece a la sección *Cyanococcus*. Sin embargo, ha sido difícil concretar la taxonomía de estas secciones debido a la poliploidía presente, falta de diferenciación cromosómica y cruces entre secciones (Song y Hancock 2011).

Las especies *V. consanguineum* y *V. floribundum* pertenecen a la sección *Pyxothanmus*. La primera es una especie nativa de Costa Rica y Panamá; mientras que la segunda se encuentra distribuida en Costa Rica, Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú. La especie *V. poasanum* pertenece a la sección *Oreades* y se puede encontrar desde Guatemala hasta Panamá (Luteyn y Wilbur 2005; Song y Hancock 2011).

Caracterización morfológica

La caracterización morfológica se define como la descripción de la variabilidad presente en una colección de germoplasma según sus características morfológicas y fenológicas de alta heredabilidad; es decir poco influenciadas por el ambiente. Al caracterizar una especie, se establece la variación existente en el genoma de la población de individuos que la conforman (González 2003; Hidalgo 2003).

La variabilidad que se encuentra en el genoma de una especie y que se expresa por medio de características visuales se conoce como fenotipo. Los caracteres que se pueden determinar por medio del fenotipo son, en su mayoría, aquellos que describen morfológicamente a la planta y su arquitectura. Estos caracteres son los que se denominan como descriptores morfológicos y se dividen en botánico- taxonómicos, morfoagronómicos y evaluativos (Hidalgo 2003; Hernández 2013).

En plantas cultivadas, los órganos de mayor interés para efectuar una descripción morfológica son los que se ven menos influenciados por el ambiente. Algunos de estos son las flores, frutos y hojas y le siguen en importancia el tallo, ramas, raíces y tejidos celulares (González 2003).

El género *Vaccinium* se caracteriza por poseer arbustos, hierbas sufrutescentes, árboles o lianas, terrestres o epífitas. Las hojas son alternas o subopuestas, enteras o serradas, pinnadamente nervadas o plinervadas. Las flores tienen el pedicelo articulado con el cáliz; este último con el tubo cilíndrico o globoso, de 4 a 5 lóbulos, corola de cilíndrica a

campanulada de 8 a 10 estambres, más o menos tan largos como la corola. Los ovarios son ínferos y los frutos abayados (Luteyn y Wilbur 2005; Hammel *et al.* 2010).

Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica del arándano se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del arándano (Judd 2014).

Reino	Plantae
Subreino	Viridiaeplantae
Infrareino	Streptophyta
División	Tracheophyta
Subdivisión	Spermatophytina
Infra división	Angiospermae
Clase	Magnoliopsida
Súper orden	Asteranae
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae
Género	<i>Vaccinium</i> L.

Mejoramiento genético en *Vaccinium*

El mejoramiento genético del arándano inició en el siglo XX, por lo que se considera que es una actividad reciente. Anteriormente, se satisfacía el mercado con frutos de las especies silvestres. Sin embargo, a partir del año 1900 la demanda del mercado aumentó a tal punto, que no pudo ser satisfecha con los bajos rendimientos de las especies silvestres. Ello motivó el inicio del mejoramiento genético del género *Vaccinium*. El primer híbrido comercial o variedad comercial de arándano fue creado por Frederick Coville, en el año 1908. Este era del tipo Highbush y fue registrado como “Brooks” (Prodorutti *et al.* 2007; Brennan *et al.* 2014).

Posteriormente, se liberaron algunas variedades obtenidas por medio de hibridación interespecífica, es decir cruces entre especies del mismo género; lo cual impulsó el mejoramiento genético de este cultivo. Se comenzaron a seleccionar progenitores para mejorar características como el rendimiento, tamaño, sabor, color y forma del fruto, hábito de crecimiento de la planta y factores nutricionales. Algunas otras características que se han mejorado son la tolerancia al estrés hídrico y a un pH más alto del suelo, resistencia al frío y a enfermedades, reducción del requerimiento de horas frío y la calidad del fruto (Prodorutti *et al.* 2007; Rowland *et al.* 2011; Brennan *et al.* 2014).

La mayor parte del mejoramiento genético de los arándanos se ha concentrado en las variedades Highbush del Norte (Northern Highbush) y del Sur (Southern Highbush), en menor medida en los tipos Rabbiteye y otros. Los Estados Unidos, Chile y Australia son los países en los cuales se ha concentrado el mejoramiento de las variedades tipo Highbush,

Chile y Georgia en las variedades Rabbiteye y Nueva Escocia en las variedades Lowbush (Rowland *et al.* 2011).

Actualmente se aplican técnicas como los marcadores moleculares para la evaluación de la diversidad genética, el cultivo de tejidos para la micropropagación de los nuevos híbridos y el uso de agentes antimitóticos (Hancock *et al.* 2008).

Uso de agentes antimitóticos

La duplicación cromosómica puede ocurrir de forma natural y es el resultado de anomalías durante la mitosis. Este fenómeno se considera de gran importancia para la evolución de las plantas por ser un mecanismo por medio del cual se genera especiación. Se pueden originar plantas autoploides que poseen órganos vegetativos y reproductivos de mayor tamaño; lo cual las hace plantas más compactas y vigorosas. La autoploidía también se puede inducir en condiciones de laboratorio por medio de agentes antimitóticos, la cual se ha convertido en una herramienta de gran utilidad para el mejoramiento de los cultivos (Otto y Whitton 2000, Escandón *et al.* 2007, Husband *et al.* 2013).

Los agentes antimitóticos son sustancias químicas que pueden generar duplicación cromosómica al ocasionar fallas en la mitosis. Como ya se mencionó, algunas de las sustancias utilizadas para estos fines son colchicina, orizalina, trifluralina y amiprofos-metil, siendo la primera la más empleada. Todos se unen a los dímeros de tubulina, lo cual previene la formación de los microtúbulos y por tanto de las fibras del huso durante la división celular. De este modo se impide la migración de los cromosomas hijos a los polos

y se induce la formación de células poliploides. Su efecto sobre la fase de inducción depende del cultivo, tipo de explante, tiempo de exposición al agente, concentración de éste y el disolvente empleado (Pintos *et al.* 2014, Escandón *et al.* 2007, Glowacka *et al.* 2010, do Valle y Tadeo 2001, Wannakraij y Tefera 2013).

El uso de estos agentes antimitóticos ha sido reportado en varios cultivos, entre ellos *Alocasia micholitziana*, *Spathiphyllum wallisii* y *Phalaenopsis*, para inducir duplicación cromosómica. Por ejemplo, en cultivos *in vitro* de tiquizque se ha reportado que con la aplicación de colchicina, se logró producir plantas tetraploides con una frecuencia entre un 80 y un 83%. También se ha informado su uso en cultivos *in vitro* de *Zantedeschia*, a una concentración de 0,05%, en donde promovió la formación de tetraploides hasta en un 42% (Henny *et al.* 2009; Huei *et al.* 2009).

De igual forma la colchicina ha sido utilizada en frutales como cítricos, uva, níspero, pera y arándano (Kadota y Niimi 2002; Miyashita *et al.* 2009). En *Aloe vera* por ejemplo, con el uso de esta sustancia se indujo un aumento de la biomasa celular de las plantas (Molero y Matos 2008). En el caso de la uva, se reporta el uso de colchicina en brotes de plantas adultas para producir hojas, flores y frutos de mayor tamaño (Gargiulo 1960). Sin embargo, varios estudios también han mostrado que la colchicina puede causar fitotoxicidad, quimeras, esterilidad y crecimiento anormal de la planta.

La orizalina por su parte, ha sido descrita como un agente antimitótico que genera mejores resultados en la duplicación cromosómica, es menos tóxica, no induce la formación de quimeras y se usa a concentraciones más bajas. En un estudio realizado en brotes haploides

de manzana establecidos *in vitro*, se compararon ambos agentes y la orizalina resultó ser más eficiente en la duplicación cromosómica. Además, en plantas haploides de gerbera *in vitro*, se probó que ambos son aptos para inducir duplicación cromosómica, pero que la orizalina es menos fitotóxica por lo que el tiempo de los tratamientos puede ser mayor para poder aumentar el número de células poliploides (Bouvier *et al.* 1994; Tosca *et al.* 1995).

En cultivos *in vitro* de *Brassica napus*, se reporta que los tres herbicidas (orizalina, trifluralina y APM) fueron más eficientes que la colchicina en la duplicación cromosómica, aún con concentraciones hasta 100 veces más bajas y con efectos similares. Se confirmó que la colchicina fue el agente antimitótico más fitotóxico; mientras que el APM fue el que presentó menor fitotoxicidad; por lo que se pudo aumentar el tiempo de exposición al tratamiento (hasta 24 horas) sin que murieran las plantas y con un 95% de efectividad en duplicación cromosómica (Hansen y Andersen 1996).

En especies del género *Vaccinium*, también se ha reportado el uso de colchicina y orizalina. En Japón, se utilizaron ambos agentes en 4 especies cultivadas *in vitro* para establecer un método eficiente para inducción de poliploidía. Los productos fueron aplicados en los brotes a distintas concentraciones y tiempos de exposición. Los niveles de ploidía fueron evaluados por citometría de flujo y recuento de cromosomas. Se comprobó que la frecuencia de la duplicación cromosómica depende del agente antimitótico usado, su concentración y la duración del tratamiento. Se observó que la orizalina, a una concentración de 0,005%, aplicada por 24 horas, indujo una mayor tasa de duplicación cromosómica que la colchicina. Se obtuvieron plantas con duplicación cromosómica de un

23.3% para *V. corymbosum* var. 'Berkeley', 5.6% en la especie *V. smallii*, 40.0% en *V. vitis-idaea* y 57.8% en *V. uliginosum* (Tsuda *et al.* 2012).

En otro estudio, se utilizó colchicina en semillas de la especie *V. arboreum*, un arbusto nativo del Sureste de los Estados Unidos que se considera un acervo genético de interés para la diversificación de *V. corymbosum*. La primera es una especie diploide, mientras que la segunda es tetraploide. En este ensayo se indujo la duplicación cromosómica *V. arboreum* para poder cruzarlo con *V. corymbosum*. Para ello se embebieron semillas secas de *V. arboreum* en 0,2% y 0,5% de colchicina durante 96 horas, lo cual dio origen a plantas tetraploides de *V. arboreum* (Haring y Lyrene 2009).

Miyashita *et al.* (2009) obtuvieron poliploides de híbridos pentaploides producto del cruce entre *V. corymbosum* (4x) y *V. ashei* (6x), con tratamientos con colchicina. Las semillas de cada especie parental y las de los cruces inter específicos fueron tratadas con 0, 500, 1000 y 2000 mg/L de colchicina por un periodo de 7 días. Como resultado, se obtuvieron anfiploides (10x) o quimeras de las semillas de los híbridos, pero no hubo duplicación cromosómica en las semillas de las especies parentales.

Citometría de flujo en plantas

La citometría de flujo es una técnica que permite analizar propiedades ópticas, así como fluorescencia y dispersión de la luz, de partículas microscópicas en suspensiones líquidas. Las células y sus organelas se analizan a una alta velocidad, hasta 1000 por segundo. El uso de este método en plantas ha venido en aumento ya que es relativamente sencillo, fiable,

demanda poca cantidad de material para analizar y no requiere de reactivos costosos (Cires y Cuesta 2011, Dolezel *et al.* 2007).

En plantas, se emplea para determinar las diferencias en el tamaño del genoma de distintas muestras, ya sea con fines taxonómicos, estudio del tamaño del genoma, para observar características fenológicas, fenotípicas y ecológicas, o para comprender la variación en el tamaño del genoma en un grupo concreto de plantas. Es decir, se puede utilizar para determinar el nivel de ploidía, diferenciar plantas femeninas de masculinas, hacer un mapeo del genoma de una planta y desarrollar estrategias para el aislamiento de genes (Costich *et al.* 1993, Cires y Cuesta 2011, Dolezel *et al.* 2007, Sikorskaite *et al.* 2013).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Accesiones de las especies *V. consanguineum* y *V. poasanum*, fueron recolectadas de las zonas altas de las provincias de Alajuela, San José y Cartago. De cada población de la primera especie se tomaron como mínimo tres arbustos con adobe que tuvieran una altura entre 50 y 150 cm. De *V. poasanum*, se logró recolectar plantas de solo una población, por no encontrarse arbustos menores a 150 cm de altura.

Los arbustos recolectados se trasplantaron en la Subestación de Fraijanes de la Estación Experimental Fabio Baudrít Moreno de la Universidad de Costa Rica, la cual se encuentra a 1764 msnm a 10° 05' de latitud Norte y 84° 16' de longitud Oeste en el Distrito 7° de Sabanilla de Alajuela. Esta zona se clasifica como bosque húmedo montano bajo. Tiene una precipitación anual de 3000 mm, los cuales se distribuyen de mayo a diciembre. La estación seca de esta zona es de enero a marzo y su temperatura promedio es de 16 °C.

Caracterización *in situ* y *ex situ* de las accesiones recolectadas

Se realizó una caracterización morfológica *in situ* y *ex situ* de las dos especies de arándano silvestre. En cada punto de colecta se tomaron datos del hábitat de cada accesión, es decir de coordenadas geográficas, altitud (m.s.n.m.), localidad y topografía según FAO (2009) y especies asociadas.

Se logró recolectar 9 accesiones de la especie *V. consanguineum* y 5 de *V. poasanum*, (Figura 1). De la primera, se recolectaron 5 accesiones de la provincia de San José, 1 de Alajuela y 3 de Cartago; mientras que de *V. poasanum* se recolectaron 2 de San José, 2 de Alajuela y 1 de Cartago.

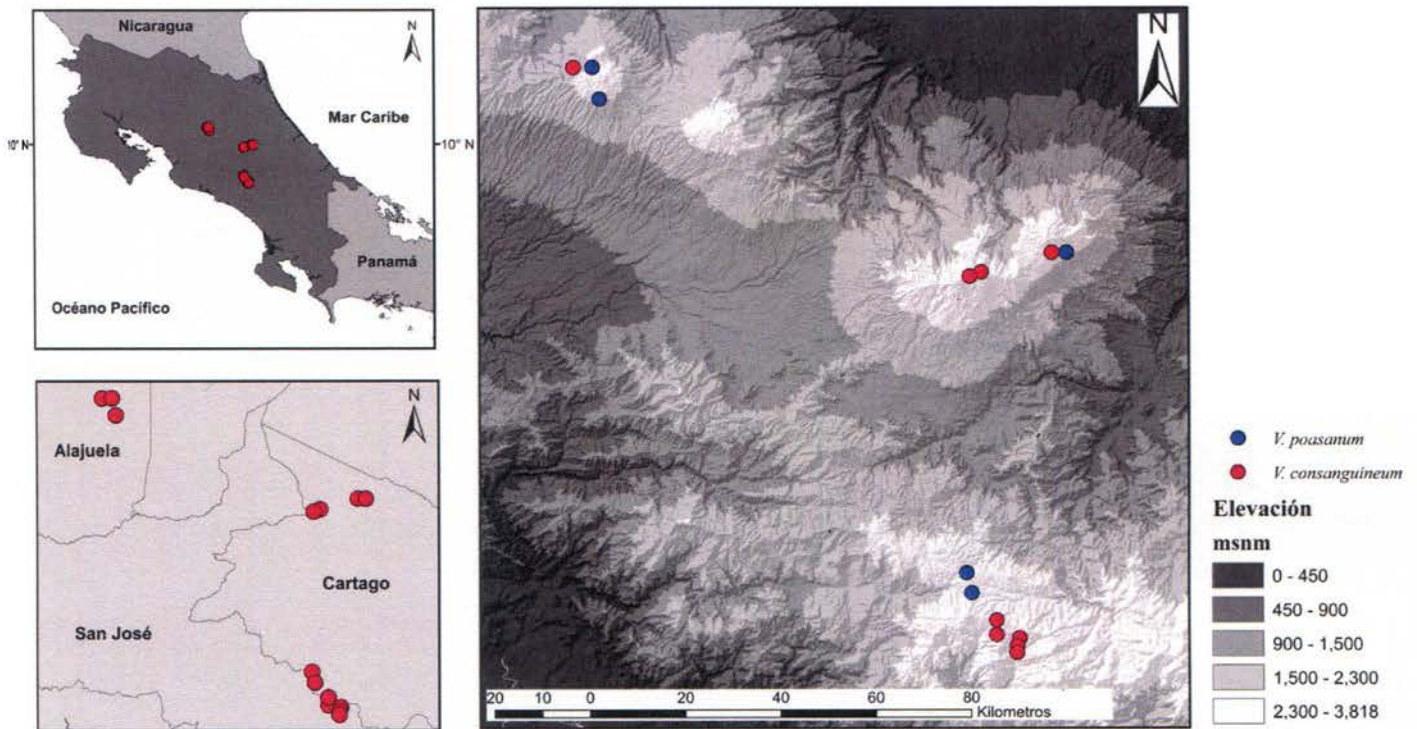


Figura 1. Puntos de colecta de accesiones de dos especies de arándano silvestre de Costa Rica (*V. consanguineum* y *V. poasanum*).

Para la caracterización *in situ* de las accesiones se recolectaron de 3 a 5 plantas y frutos maduros. Se consideraron 11 descriptores cuantitativos y 6 cualitativos. Dentro de los cuantitativos están: el grosor (mm), ancho (mm) y longitud de la hoja (mm), altura de la planta (cm), grosor de tallo (mm), grosor de brotes florales y vegetativos (mm), diámetro de

frutos (mm), peso (mg) de diez frutos, concentración de sólidos solubles (°Brix) y cantidad de flores por rama. Los descriptores cualitativos fueron la forma y color de la hoja, color de brotes florales y vegetativos y coloración de flores y frutos. En total se efectuaron 18 giras para la toma de datos de descriptores cuantitativos y cualitativos; por lo que se visitó cada punto de muestreo al menos tres veces.

Se recolectaron plantas de menos de 1,5 m de cada población caracterizada *in situ*. Al momento del trasplante, se sembraron a una distancia de 1,5 m entre plantas y de 2 m entre hileras. Seis meses después del trasplante de la última accesión recolectada, se realizó la caracterización *ex situ*, siguiendo la misma metodología empleada para la caracterización *in situ* pero únicamente se tomó en cuenta las variables vegetativas.

De cada descriptor cuantitativo se obtuvo el promedio y error estándar. Además, se realizó un análisis de correlación lineal de Pearson por especie con los datos cuantitativos tomados *in situ*. Ambos análisis se realizaron con el programa InfoStat versión 2014. Los datos obtenidos a partir de los descriptores cualitativos no fueron sometidos a ningún análisis estadístico.

Establecimiento *in vitro* de *V. consanguineum* y *V. poasanum* a partir de semillas

Esta parte del trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica.

Las semillas se extrajeron de frutos maduros de cada especie. Para ello se abrieron los frutos y se dejaron en agua durante una semana. Transcurrido este período, se eliminó los

restos de tejido del fruto, se enjuagaron las semillas en un colador de malla fina y se dejaron secar sobre papel durante tres días a temperatura ambiente. Finalmente, se almacenó cada lote de semilla en viales de vidrio debidamente identificados a una temperatura de 4° C y en oscuridad hasta que se fueran a utilizar.

Desinfección de las semillas

Antes de aplicar algún tratamiento para inducir la germinación de semillas, estas debieron ser desinfectadas. Para esto, se colocó cada lote de semillas en un erlenmeyer de 250 ml. Se agregó alcohol al 70%, y se agitó durante un minuto. El alcohol se eliminó, se agregó hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5% y se agitó nuevamente durante 10 minutos en agitador orbital. Posteriormente, dentro de una cámara de flujo laminar, se realizó el lavado de las semillas con agua desionizada autoclavada. Se colocó las semillas sobre un embudo con papel filtro estéril sobre un erlenmeyer de 250 ml también estéril y se les agregó agua suficiente para eliminar el hipoclorito.

Germinación *in vitro* de las semillas de *V. consanguineum* y *V. poasanum*

De acuerdo a lo reportado en la literatura, la germinación de semillas de especies silvestres se caracteriza por ser lenta y escalonada, fenómeno que también ha sido reportado para especies de *Vaccinium* (Castro *et al.* 2012, Baskin *et al.* 2000). Estas características que pueden ser limitantes para evaluar plantas a partir de semillas, por lo que se recurre a tratamientos con ácido giberélico (GA₃) para homogenizar y acelerar la germinación en este tipo de semillas (MagnitSkiy y Ligarreto 2007, Hernández *et al.* 2009, Novoa 2010).

Para homogenizar y acelerar la germinación de *V. consanguineum* y *V. poasanum*, se trataron semillas con 50, 500 y 1000 mg/L de ácido giberélico. Primeramente, se inocularon semillas previamente desinfectadas en placas petri de 9 cm de diámetro con medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 50 mg/L de GA₃. En cada plato se dispensaron 10 ml de medio y se inocularon 70 semillas por plato. Paralelamente se prepararon dos soluciones de 50 ml con concentraciones altas de GA₃ (500 y 1000 mg/L) donde se embebieron las semillas durante 12 horas. Una vez transcurrido este periodo, se inocularon las semillas en medio MS suplementado con 15 mg/L de GA₃, igualmente en placas Petri desechables de 9 cm de diámetro. Se inocularon entre 6 y 16 repeticiones por tratamiento, dependiendo de la cantidad de semilla por lote. La unidad experimental fue una placa Petri con 70 semillas.

Para cada tratamiento se determinó el porcentaje de germinación y plántulas establecidas; y se sacó el promedio y el error estándar con el programa InfoStat versión 2014. No se presenta ningún otro tipo de análisis estadístico ya que se debió emplear distintos lotes de semilla para cada tratamiento por la escasez de ésta durante el experimento.

Efecto de dos agentes antimutagénicos sobre el nivel de ploidía de *V. consanguineum* y *V. poasanum*

Cuando las vitroplantas obtenidas de las semillas que germinaron *in vitro* alcanzaron 1 cm de altura, se transfirieron a medio de WPM (Lloyd y McCown 1981) suplementado con 0,5 mg/L de Zeatina. Luego se subcultivaron cada 22 días a medio fresco hasta que se formara una cepa de brotes y la mayoría de estos alcanzaran 1 cm de longitud, para poder utilizarlos

en los tratamientos con agentes antimitóticos. Para esto se efectuaron algunas pruebas preliminares con colchicina y orizalina a una concentración de 228 mg/L y 3 mg/L, respectivamente, en dos accesiones de la especie *V. consanguineum* (A007 y A015) y en una de *V. poasanum* (A023) en medio de WPM durante 10 días. Esto para observar la oxidación que pudiera presentarse en los tratamientos. Posteriormente, se decidió realizar un cambio en la metodología y se utilizó brotes de 1 cm de longitud que fueron inoculados en medio WPM líquido suplementado con estos agentes antimitóticos en concentraciones de 50, 100 y 150 mg/L, durante 24, 48 y 96 horas en agitación a 70 rpm.

Cada tratamiento constó de 4 repeticiones. La unidad experimental fue un frasco con 5 explantes. Se utilizó 4 repeticiones del testigo (WPM sin antimitóticos), según el tiempo de exposición y la accesión. Todos los tratamientos se mantuvieron en oscuridad a $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Pasado el tiempo de exposición al agente antimitótico, los explantes se transfirieron a medio WPM sólido suplementado con 0,5 mg/L de Zeatina y se incubaron a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ con una intensidad lumínica de 4300 lux y un fotoperíodo de 16 horas luz. Los explantes se subcultivaron cada 22 días.

En este ensayo no se pudo tratar vitroplantas de *V. poasanum* debido a que la cantidad de material era escasa por falta de semilla y el bajo porcentaje de germinación que presentaron las semillas de esta especie. Sin embargo, si se pudo realizar una prueba preliminar para esta especie, en la cual se trató brotes de 1 cm de longitud con 50 mg/L de colchicina y de orizalina por 96 horas en medio WPM líquido. Cada tratamiento constó de 2 repeticiones.

Con el agente antimetabólico orizalina debió corregirse las concentraciones a utilizar, ya que a partir de 100 mg/l se presentó precipitación del compuesto después de 24 horas de iniciada la aplicación de los tratamientos, a pesar de estar en constante agitación. Por tanto, para los ensayos subsiguientes se cambiaron las concentraciones de orizalina a 25, 50 y 75 mg/L. Las condiciones de cultivo se mantuvieron igual.

El diseño estadístico utilizado fue el irrestricto al azar y se determinó el porcentaje de sobrevivencia y contaminación de los explantes en cada tratamiento. De este último no se presentan datos, ya que solo se tomó como medida de monitoreo. Los datos obtenidos a partir del porcentaje de sobrevivencia se sometieron a análisis de modelos mixtos con el programa SAS Studio por medio de la prueba de Tukey- Kramer y con alpha igual a 0,05. En este modelo se establecieron tres factores fijos (accesión, concentración y tiempo) y 4 factores aleatorios (los referidos a la réplica).

Análisis de citometría de flujo

Para determinar el efecto de los agentes antimetabólicos sobre las dos especies de arándano silvestre, se recurrió al empleo de análisis de citometría de flujo. Por medio de estos análisis y con base en un testigo de ploidía conocida, se clasificaron las vitroplantas de cada tratamiento ejecutado en diploides, mixoploides y tetraploides.

Primeramente, se requirió realizar un protocolo para poder efectuar los análisis con citometría de flujo. En este caso, por contar con un citómetro BD FASC Calibur, se utilizó el buffer Galbraith (Galbraith *et al.* 1983), Ioduro de propidio como fluorocromo y ARNasa. Sin embargo, por tratarse de especies de arándano silvestre que poseen un alto

contenido de polifenoles (CITA 2013), se requirió utilizar un polímero que contrarrestara los efectos negativos del citosol. Para esto, se utilizó la polivinilpirrolidona (PVP) que se emplea como agente reductor para preservar las proteínas de cromatina y contrarrestar la interferencia de compuestos fenólicos con la tinción de ADN (Dolezel y Bartos 2005, Dolezel *et al.* 2007, Loureiro *et al.* 2007, Pasqual *et al.* 2012).

Para determinar la concentración óptima de PVP por litro de buffer, se efectuaron análisis con citometría de flujo con muestras de hojas de *V. corymbosum*, *V. consanguineum* y *V. poasanum* y *P. vulgaris* (testigo) a concentraciones de 0,5 a 10 mg/L de PVP. Para esto, se siguió la metodología descrita por Dolezel *et al.* (2007). Se efectuaron además, pruebas de oxidación de las suspensiones celulares con dichas especies y las concentraciones de PVP ya mencionadas. Para ello se cortaron 30 mg de hoja de cada especie en 1 ml de buffer a distintas concentraciones del polímero, se filtraron y se colocó cada suspensión celular en tubos de vidrio para observar si se producía oxidación de la muestra. Una vez obtenida una coloración similar a la del tejido testigo, se efectuaron análisis de citometría de flujo con las concentraciones escogidas, todas superiores a 5 mg/L. En estos, se observó que a 5 mg/L el coeficiente de variación fue inferior a 5%, al igual que a concentraciones más altas. Por tanto, se decidió emplear dicha concentración.

Posteriormente, se siguieron los protocolos descritos por Dolezel *et al.* (2007) y Koutoulis *et al.* (2005) para realizar análisis por citometría de flujo. Se requirió de aproximadamente 30 mg de hoja por explante, por repetición; por lo que se debió esperar entre 16 y 20 semanas para obtener esta cantidad de material. De cada tratamiento, se analizaron 4

vitroplantas, una por repetición. Para esto, se tomaron los 30 mg de hoja de cada explante seleccionado en una cámara de flujo laminar, se colocaron en un tubo de 2 ml con agua desionizada estéril para su transporte y análisis con el citómetro de flujo en el Laboratorio de Bioquímica de la Escuela de Medicina de la Universidad de Costa Rica.

Para el análisis se colocó cada muestra en una placa Petri desechable y estéril de 9 cm de diámetro y se le agregó 1 mL de buffer de Galbraith suplementado con 5 mg/L de PVP. Con ayuda de un bisturí se cortaron las hojas finamente. La mezcla obtenida se filtró con una malla de nylon de 31 μm para eliminar cualquier residuo. Al filtrado se le agregó 50 μg de Ioduro de propidio y 50 μg de ARNasa y se agitó manualmente. Finalmente, cada muestra se colocó en el citómetro y se analizó con el programa CellQuest Pro. Para calibrar el equipo se utilizaron hojas de frijol de plantas crecidas en invernadero y de una variedad comercial de arándano (*V. corymbosum*) establecida *in vitro*.

Los resultados obtenidos se analizaron con el programa FCS Express 4 Flow Research Edition. Posteriormente se clasificó las muestras en diploides, mixoploides y tetraploides y se determinó el porcentaje de la clasificación para cada tratamiento. Para que el análisis de citometría de flujo sea estadísticamente significativo debe tener al menos 5000 eventos celulares y poseer un coeficiente de variación inferior a 5% (Dolezel *et al.* 2007).

RESULTADOS

Identificación de especies

Las muestras de las distintas accesiones de las especies recolectadas de arándano silvestre, fueron identificadas en el Herbario Nacional y la Universidad Nacional. Una de las especies se clasificó como *V. poasanum*. Sin embargo se presentó una divergencia en cuanto a la identificación de la otra especie, ya que en el Herbario Nacional ésta se identificó como *V. consanguineum* (en el Parque Nacional Volcán Poás se encontró clasificada de igual forma), mientras que Poveda (2013)² la identificó como *V. floribundum*. Para efectos de este estudio se usó el nombre científico *V. consanguineum* para referirse a esta especie.

Caracterización morfológica *in situ* de accesiones de arándano silvestre

Datos pasaporte

A continuación se presentan datos pasaporte de las accesiones obtenidas de las dos especies de arándano silvestre recolectadas *V. consanguineum* (*V. floribundum*) y *V. poasanum*.

² Poveda, L. 2013. Especies silvestres de arándanos (entrevista). Heredia, CR, Universidad Nacional.

Accesiones de *V. consanguineum*.

1. A006

Posición: N 9° 36'08.9" Altitud: 2825 m.s.n.m.

W 83° 48'00.9"

Ubicación: Entrada del Parque Nacional los Quetzales en el Cerro de la Muerte, provincia de San José. Área de reforestación que colinda con bosque secundario. La topografía del lugar es ondulada con iluminación directa. Se encuentra creciendo sobre piedra y está asociada a *Pernettya postrata* (arrayán) y otras ericáceas. Se presentan como arbustos con una altura promedio de 82 cm. Los tallos son de puberulentos a glabros. Las hojas son angostas, agudas en la base, gradualmente agudas en el ápice, glabras o glabras y de serruladas a crenado-serradas. Posee inflorescencias racemosas con varias flores que presentan una corola glabra, blanca y cilíndrica, cáliz de rosado a verde y pedicelos de verde a rojizos. Los frutos son glabros, globosos, de aproximadamente 6,7 mm de diámetro y de color negro púrpura al madurar.

2. A007

Posición: N 9° 37'03.9" Altitud: 2975 m.s.n.m.

W 83° 49'09.9"

Ubicación: Del Restaurante "El Chespirito", 2 km hacia El Empalme en el Cerro de la Muerte, provincia de San José a orillas de la Carretera Interamericana Sur. La topografía del lugar es irregular con iluminación directa y difusa. La población está asociada a *P. postrata* y otras ericáceas. Son arbustos con una altura promedio de 86 cm. Los tallos son

de puberulentos a glabrados. Las hojas son angostas, agudas en la base, gradualmente agudas en el ápice, glabras o glabras y de serruladas a crenado-serradas. Posee inflorescencias racemosas con varias flores que presentan una corola glabra, cilíndrica y blanca con tintes rosados, cáliz de rosado a verde y pedicelos de verde a rojizos. Los frutos son glabros, globosos, de aproximadamente 8,3 mm de diámetro y de color negro púrpura al madurar.

3. A012

Posición: N 10° 11'53.2" Altitud: 2314 m.s.n.m.

W 84° 14'19.1"

Ubicación: Parque Nacional Volcán Poás en la provincia de Alajuela. Área de reforestación contigua a bosque secundario. La topografía del lugar es ondulada con iluminación difusa. Se encuentra creciendo sobre piedra y está asociada a *P. postrata*, *Vaccinium* sp. y otras ericáceas. Son arbustos con una altura promedio de 60 cm. Los tallos son de puberulentos a glabrados. Las hojas son angostas, agudas en la base, gradualmente agudas en el ápice, glabras o glabras y de serruladas a crenado-serradas. Posee inflorescencias racemosas con varias flores que presentan una corola glabra, cilíndrica y blanca con tintes rosados, cáliz de rosado a verde y pedicelos de verde a rojizos. Los frutos son glabros, globosos, de aproximadamente 6,4 mm de diámetro y de color negro púrpura al madurar.

4. A013

Posición: N 9° 35'55.4" Altitud: 2952 m.s.n.m.

W 83° 47'43.0"

Ubicación: 50 m de la entrada de San Gerardo de Dota en la provincia de San José. Bosque secundario a la orilla del camino. La topografía del lugar es irregular con iluminación difusa. Está asociada a helechos, bromelias y otras. Son árboles o arbustos entre 300 y 60 cm de altura. Las hojas son angostas, agudas en la base, gradualmente agudas en el ápice, glabras o glabras y de serruladas a crenado-serradas. Posee inflorescencias racemosas con varias flores que presentan una corola glabra, blanca y cilíndrica, cáliz de rosado a verde y pedicelos de verde a rojizos. Los frutos son glabros, globosos, de aproximadamente 9,2 mm de diámetro y de color negro púrpura al madurar.

5. A014

Posición: N 9° 35'25.7"

Altitud: 2776 m.s.n.m.

W 83° 47'52.7"

Ubicación: 2 Km de la entrada de San Gerardo de Dota en la provincia de San José. Se encuentra en un lote baldío. La topografía del lugar es irregular y la iluminación es directa. Está asociada a helechos y bromelias. Son árboles o arbustos entre 300 y 75 cm de altura. Las hojas son angostas, agudas en la base, gradualmente agudas en el ápice, glabras o glabras y de serruladas a crenado- serradas. Posee inflorescencias racemosas con varias flores que presentan una corola glabra, cilíndrica y blanca con tintes rosados, cáliz de rosado a verde y pedicelos de verde a rojizos. Los frutos son glabros, globosos, de aproximadamente 9,2 mm de diámetro y de color negro púrpura al madurar.

6. A015

Posición: N 9° 35'00.7" Altitud: 2605 m.s.n.m.

W 83° 47'53.1"

Ubicación: Hotel "Dantica Cloud Forest Lodge" en San Gerardo de Dota en la provincia de San José. Se encuentra en un bosque secundario. La topografía del lugar es fracturada y la iluminación es tanto difusa como directa. Está asociada a ericáceas y bromelias. Son árboles o arbustos entre 300 y 75 cm de altura. Las hojas son angostas, agudas en la base, gradualmente agudas en el ápice, glabras o glabras y de serruladas a crenado- serradas. Posee inflorescencias racemosas con varias flores que presentan una corola glabra, cilíndrica y blanca con tintes rosados, cáliz de rosado a verde y pedicelos de verde a rojizos. Los frutos son glabros, globosos, de aproximadamente 7,6 mm de diámetro y de color negro púrpura al madurar.

7. A018

Posición: N 9° 58'55.1" Altitud: 3219 m.s.n.m.

W 83° 50'02.8"

Ubicación: 150 m de la entrada del Parque Nacional Volcán Irazú en la provincia de Cartago. Se encuentra en un páramo. La topografía del lugar es ondulada y la iluminación es directa. Está asociada a *P. prostrata*. Son arbustos con una altura promedio de 109 cm. Las hojas son angostas, agudas en la base, gradualmente agudas en el ápice, glabras o glabras y de serruladas a crenado- serradas. Posee inflorescencias racemosas con varias flores que presentan una corola glabra, blanca y cilíndrica, cáliz de rosado a verde y

pedicelos de verde a rojizos. Los frutos son glabros, globosos, de aproximadamente 6,9 mm de diámetro y de color negro púrpura al madurar.

8. A019

Posición: N 9° 58'39.8" Altitud: 3339 m.s.n.m.

W 83° 50'46.1"

Ubicación: Parque Nacional Volcán Irazú en la provincia de Cartago. Se encuentra en un páramo. La topografía del lugar es ondulada y la iluminación es directa. Está asociada a *P. prostrata*. Son arbustos con una altura promedio de 111 cm. Las hojas son angostas, agudas en la base, gradualmente agudas en el ápice, glabras o glabradas y de serruladas a crenado-serradas. Posee inflorescencias racemosas con varias flores que presentan una corola glabra, blanca y cilíndrica, cáliz de rosado a verde y pedicelos de verde a rojizos. Los frutos son glabros, globosos, de aproximadamente 9,0 mm de diámetro y de color negro púrpura al madurar.

9. A024

Posición: N 10° 00'08.9" Altitud: 2714 m.s.n.m.

W 83° 45'39.9"

Ubicación: 25 m de la entrada del Parque Nacional Volcán Turrialba en la provincia de Cartago. Se encuentra en un potrero. La topografía del lugar es fracturada con iluminación difusa. Está asociada con *V. poasanum* y otras ericáceas. Son arbustos con una altura promedio de 89 cm. Las hojas son angostas, agudas en la base, gradualmente agudas en el

ápice, glabras o glabras y de serruladas a crenado- serradas. Posee inflorescencias racemosas con varias flores que presentan una corola glabra, blanca y cilíndrica, cáliz de rosado a verde y pedicelos de verde a rojizos. Los frutos son glabros, globosos, de aproximadamente 7,8 mm de diámetro y de color negro púrpura al madurar.

Accesiones de *V. poasanum*

1. A004

Posición: N 9° 40'01.2"

Altitud: 2675 m.s.n.m.

W 83° 51'01.5"

Ubicación: 3 km al este del mojón 66 de la Carretera Interamericana Sur en el Cerro de la Muerte en la provincia de San José. Se encuentra en una orilla de calle en una ladera. La topografía del lugar es irregular con iluminación difusa. Está asociada con *P. prostrata* y otras ericáceas. Son árboles, epífitos o terrestres con una altura entre 2 y 3 metros. Los tallos son glabros y las hojas son ovadas, lanceoladas y elípticas, agudas en el ápice, glabras, coriáceas y agudas en la base. Posee inflorescencias umbelo-racemosas de corola verde crema a crema, cilíndrica y glabra. Los frutos son glabros, subglobosos, de color morado oscuro al madurar y de 9,7 mm de diámetro.

2. A020

Posición: N 10° 09'46.7"

Altitud: 2373 m.s.n.m.

W 84° 13'46.5"

Ubicación: 2 Km de la entrada del Parque Nacional Volcán Poás en la provincia de Alajuela. Se encuentra a la orilla de carretera en una ladera. La topografía del lugar es

irregular con iluminación difusa. Está asociada a otras ericáceas. Son árboles, epífitos o terrestres con una altura entre 2,50 y 3 metros. Los tallos son glabros. Las hojas son de ovadas, lanceoladas a elípticas, agudas en el ápice, glabras, coriáceas y agudas en la base. Posee inflorescencias umbelo-racemosas de corola verde crema a crema, cilíndrica y glabra. Los frutos son glabros, subglobosos, de color morado oscuro al madurar y de 10,0 mm de diámetro.

3. A021

Posición: N 10° 11'45.9" Altitud: 2362 m.s.n.m.

W 84° 14'12.9"

Ubicación: Parque Nacional Volcán Poás en la provincia de Alajuela. Se encuentra en un bosque secundario. La topografía del lugar es fracturada con iluminación difusa. Está asociada a *V. consanguineum* y otras ericáceas. Son árboles o arbustos, epífitos o terrestres con una altura entre 400 y 450 cm. Los tallos son glabros. Las hojas son de ovadas, lanceoladas a elípticas, agudas en el ápice, glabras, coriáceas y agudas en la base. Posee inflorescencias umbelo-racemosas de corola verde crema a crema, cilíndrica y glabra. Los frutos son glabros, subglobosos, de color morado oscuro al madurar y de 10,2 mm de diámetro.

4. A022

Posición: N 9° 38'46.7" Altitud: 2772 m.s.n.m.

W 83° 50'42.2"

Ubicación: Kilómetro 77 de la Carretera Interamericana Sur en la provincia de San José. Se encuentra a la orilla de la calle en una ladera. La topografía del lugar es ondulada con iluminación difusa. Está asociada a otras ericáceas, helechos y *P. postrata*. Son árboles, epífitos o terrestres con una altura de aproximadamente 300 cm. Los tallos son glabros. Las hojas son de ovadas, lanceoladas a elípticas, agudas en el ápice, glabras, coriáceas y agudas en la base. Posee inflorescencias umbelo-racemosas de corola verde crema a crema, cilíndrica y glabra. Los frutos son glabros, subglobosos, de color morado oscuro al madurar y de 10,4 mm de diámetro.

5. A023

Posición: N 10° 00'08.9"

Altitud: 2715 m.s.n.m.

W 83° 45'39.9"

Ubicación: 200 m de la entrada del Parque Nacional Volcán Turrialba en la provincia de Cartago. Se encuentra en un potrero. La topografía del lugar es fracturada con iluminación directa. Está asociada a *V. consanguineum*. Son árboles o arbustos, epífitos o terrestres con una altura entre 400 y 70 cm. Los tallos son glabros. Las hojas son de ovadas, lanceoladas a elípticas, agudas en el ápice, glabras, coriáceas y agudas en la base. Posee inflorescencias umbelo-racemosas de corola verde crema a crema, cilíndrica y glabra. Los frutos son glabros, subglobosos, de color morado oscuro al madurar y de 9,6 mm de diámetro.

Descriptorios cuantitativos

En el cuadro 2, se muestran los descriptorios cuantitativos de las accesiones de la especie *V. consanguineum*. En relación con la altura de la planta, se observa que esta característica

varía entre los 60 y 219 cm. El grosor del tallo varía entre 8 y 20 mm, el espesor de la hoja entre 0,2 y 0,4 mm, el ancho entre 6 y 12 mm y la longitud entre 19 y 37 mm. El grosor de los brotes florales se encuentra entre 0,6 a 2,5 mm, mientras que el de los brotes vegetativos entre 0,4 y 2,4 mm. El número de flores por rama también difiere considerablemente entre accesiones, siendo la A024 la accesión con menor cantidad de flores (5 por rama) y A014 la de mayor número (108 por rama). El peso de 10 frutos oscila entre 2,1 y 5,9 g. La cantidad de sólidos solubles se encuentra entre 10 y 14 °Brix; mientras que el diámetro de los frutos se halla entre los 6,4 y 9,2 mm.

Para la especie *V. poasanum*, la altura de la planta varía entre 124 y 300 cm. El grosor del tallo se halla entre 12 y 25 mm; sin embargo este descriptor no fue posible cuantificarlo en todas las accesiones debido al difícil acceso a la base del tallo. En cuanto a los descriptores de hoja, el espesor se encuentra en un rango de 0,3 a 0,6 mm, el ancho de 24,2 a 33,2 y la longitud de 51,9 a 58,3 mm. Para el grosor de brotes florales y vegetativos el promedio registrado fue de 1,6 mm y entre 0,8 y 1,5 mm respectivamente. El número de flores por rama, al igual que en *V. consanguienum*, varía según la accesión, A004 posee 14 flores por rama en promedio, siendo la de menor cantidad y A021 contiene 70 flores por rama, siendo la de mayor número. El peso de 10 frutos varía entre 3,3 y 5,9 g; mientras que la concentración de sólidos solubles oscila entre 5,8 y 8 °Brix. En cuanto al valor del diámetro del fruto, se puede observar que hubo poca variabilidad entre las accesiones el cual se halla entre 9,6 a 10,4 mm (Cuadro 3).

Cuadro 2. Descriptores cuantitativos de accesiones de la especie *V. consanguineum* evaluados *in situ*.

Accesión	Altura planta (cm)	Grosor tallo (mm)	Grosor de hoja (mm)	Ancho de hoja (mm)	Longitud de hoja (mm)	Grosor brotes florales (mm)	Grosor brotes vegetativos (mm)	No. Flores/rama	Diámetro de frutos (mm)	Peso de 10 frutos (g)	° Brix
A006	81,8 ± 6,9	12,4 ± 1,4	0,3 ± 0,02	8,0 ± 1,1	20,0 ± 1,0	2,5 ± 0,4	2,4 ± 0,1	49,8 ± 8,7	6,7 ± 0,1	2,8 ± 0,2	13,4 ± 1,8
A007	86,4 ± 30,9	12,1 ± 1,3	0,2 ± 0,01	8,2 ± 0,3	19,7 ± 0,7	2,2 ± 0,3	0,9 ± 0,1	34,2 ± 6,8	8,3 ± 0,3	2,8 ± 0,2	10,8 ± 0,2
A012	60,6 ± 2,9	16,1 ± 2,2	0,4 ± 0,03	9,1 ± 0,9	21,3 ± 1,1	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	17,0 ± 2,9	6,4 ± 0,2	4,1 ± 0,8	13,5 ± 0,3
A013	123,6 ± 44,3	21,1 ± 3,6	0,3 ± 0,02	11,8 ± 0,3	31,8 ± 2,4	1,9 ± 0,0	1,3 ± 0,04	63,6 ± 11,6	9,2 ± 0,3	5,3 ± 0,0	14,0 ± 0,0
A014	219,0 ± 59,3	8,3 ± 1,0	0,3 ± 0,03	10,4 ± 0,4	28,9 ± 0,8	1,9 ± 0,3	1,7 ± 0,2	108,0 ± 10,7	9,2 ± 0,2	5,9 ± 0,0	13,0 ± 0,0
A015	102,0 ± 8,6	10,7 ± 1,3	0,3 ± 0,02	11,3 ± 0,3	37,4 ± 1,3	1,3 ± 0,3	1,4 ± 0,1	91,0 ± 4,0	7,5 ± 0,2	4,0 ± 0,1	11,0 ± 0,8
A018	109,0 ± 14,1	19,8 ± 1,2	0,3 ± 0,03	6,7 ± 0,2	19,5 ± 0,6	1,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	32,8 ± 6,9	6,9 ± 0,1	2,1 ± 0,2	11,8 ± 0,6
A019	111,2 ± 10,8	19,8 ± 5,2	0,3 ± 0,02	8,1 ± 0,5	22,4 ± 0,7	1,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	26,6 ± 4,1	9,0 ± 0,4	4,4 ± 0,3	12,4 ± 0,9
A024	89,2 ± 21,8	16,4 ± 1,2	0,2 ± 0,03	9,18 ± 0,4	20,6 ± 0,6	1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,3	5,0 ± 0,8	7,8 ± 0,1	2,5 ± 0,1	10,2 ± 0,2

* Valor promedio ± Error estándar

Cuadro 3. Descriptores cuantitativos de accesiones de la especie *V. poasanum* evaluados *in situ*.

Accesión	Altura planta (cm)	Grosor tallo (mm)	Grosor de hoja (mm)	Ancho de hoja (mm)	Longitud de hoja (mm)	Grosor brotes florales (mm)	Grosor brotes vegetativos (mm)	No. Flores/rama	Diámetro de frutos (mm)	Peso de 10 frutos (g)	° Brix
A004	250,0 ± 28,28	-	0,4 ± 0,02	24,2 ± 0,88	51,9 ± 2,9	-	-	13,4 ± 2,82	9,7 ± 0,4	5,5 ± 0,4	5,8 ± 0,8
A020	275,0 ± 25,0	24,7 ± 0,0	0,6 ± 0,04	29,6 ± 1,33	54,8 ± 1,75	1,6 ± 0,18	1,1 ± 0,05	36,4 ± 12,45	10,0 ± 0,2	4,0 ± 0,0	5,8 ± 0,3
A021	124,6 ± 69,49	12,7 ± 2,29	0,6 ± 0,05	33,2 ± 1,94	58,3 ± 2,38	-	1,5 ± 0,17	70,6 ± 4,79	10,2 ± 0,2	5,5 ± 0,3	5,9 ± 0,1
A022	300,0 ± 0,0	-	0,3 ± 0,04	32,5 ± 1,72	57,0 ± 1,85	-	0,8 ± 0,07	36,8 ± 5,33	10,4 ± 0,2	5,9 ± 0,0	7,0 ± 0,0
A023	183,3 ± 108,37	25,0 ± 0,0	0,4 ± 0,06	29,4 ± 2,82	54,1 ± 6,17	-	-	14,0 ± 2,59	9,6 ± 0,3	3,3 ± 0,0	8,0 ± 0,0

* Valor promedio ± Error estándar

Descriptores cualitativos

Los datos obtenidos a partir de las variables cualitativas no presentaron variabilidad entre accesiones de cada especie; por tal motivo no se efectuó ningún análisis estadístico con éstos. En la figura 2, se muestran imágenes de los descriptores cualitativos considerados en este estudio.













Especie	Color y forma de hoja	Color de brotes vegetativos	Color de brotes florales	Color y forma de flores	Color y forma de frutos	Forma de copa
<i>V. consanguineum</i>						
<i>V. poasanum</i>						

Figura 2. Descriptores cualitativos para dos especies de arándano silvestre de Costa Rica (*V. consanguineum* y *V. poasanum*).

Análisis de correlación

Se efectuó un análisis de correlación lineal de Pearson para los caracteres cuantitativos evaluados *in situ* de ambas especies. Este análisis omite la variable grosor de tallo de la especie *V. poasanum* debido a que no fue posible obtener la cantidad de datos necesarios.

Según este análisis, para *V. consanguineum* se observó una fuerte correlación positiva entre los descriptores de ancho de hoja con longitud de hoja y número de flores por rama, con la longitud de hoja. Se observa además, una asociación moderada entre las variables grosor de brotes vegetativos y grosor de brotes florales y entre longitud de hoja y el peso de 10 frutos (Cuadro 4).

En el cuadro 5 se observa el análisis de correlación de la especie *V. poasanum*. En este se determinó una fuerte correlación positiva entre la longitud y el ancho de hoja, el grosor de brotes vegetativos y el número de flores por rama, el diámetro de frutos y los grados °Brix y una fuerte correlación negativa entre el grosor de brotes vegetativos con los grados °Brix. También, se denota una correlación moderada entre el grosor de hoja, el grosor de brotes vegetativos y número de flores por rama y entre la longitud de la hoja y los grados °Brix.

Cuadro 4. Correlación de descriptores cuantitativos evaluados *in situ* para la especie *V. consanguineum*.

Variable	Ancho de hoja (mm)	Longitud de hoja (mm)	Altura de planta (mm)	Grosor de tallo (mm)	Grosor brotes florales (mm)	Grosor brotes vegetativos (mm)	No. Flores/rama	Diámetro de frutos (mm)	Peso de 10 frutos (g)	° Brix
Grosor de hoja (mm)	0,36	0,28	0,02	0,04	-0,36	-0,24	0,28	0,08	0,45	0,05
Ancho de hoja (mm)		0,77	0,19	-0,02	-0,07	0,22	0,46	0,32	0,42	-0,12
Longitud de hoja (mm)			0,29	-0,15	-0,06	0,15	0,7	0,35	0,5	-0,03
Altura planta (cm)				-0,08	0,07	0,07	0,38	0,41	0,38	0,06
Grosor tallo (mm)					-0,22	-0,32	-0,43	-0,06	-0,07	-0,11
Grosor brotes florales (mm)						0,51	0,17	0,15	-0,18	0,1
Grosor brotes vegetativos (mm)							0,25	-0,02	-0,04	0,06
No. Flores/rama								0,36	0,36	0,18
Diámetro de frutos (mm)									0,35	-0,16
Peso de 10 frutos (g)										0,17

Cuadro 5. Correlación de descriptores cuantitativos evaluados *in situ* para la especie *V. poasanum*.

Variable	Ancho de hoja (mm)	Longitud de hoja (mm)	Altura de planta (cm)	Grosor brotes florales (mm)	Grosor brotes vegetativos (mm)	No. Flores/rama	Diámetro de frutos (mm)	Peso de 10 frutos (mg)	° Brix
Grosor de hoja (mm)	0,17	0,08	-0,23	-0,2	0,6	0,51	0,17	0,03	-0,49
Ancho de hoja (mm)		0,73	-0,22	-0,78	0,28	0,41	0,31	-0,03	0,4
Longitud de hoja (mm)			0,28	-0,04	0,21	0,19	0,38	-0,15	0,6
Altura planta (cm)				sd	-0,38	-0,51	0,24	-0,6	0,4
Grosor brotes florales (mm)					0,41	0,39	0,04	sd	sd
Grosor brotes vegetativos (mm)						0,76	0,41	0,36	-0,83
No. Flores/rama							0,4	0,37	-0,33
Diámetro de frutos (mm)								-0,29	0,76
Peso de 10 frutos (mg)									-0,43

sd: Número insuficiente de datos

Caracterización morfológica *ex situ* de accesiones de arándano silvestre

Como se puede observar en el cuadro 6, para la caracterización morfológica *ex situ* se lograron establecer 8 accesiones de la especie *V. consanguineum* y una de *V. poasanum*. Como ya se mencionó, solo se pudieron recolectar plantas de una accesión de la segunda especie debido a que no se encontraron arbustos con tamaño inferior a 1,5 m de altura que pudieran ser trasplantados. Con respecto a *V. consanguineum*, no en todas las accesiones se hallaron la cantidad necesaria de plantas con el porte requerido. Sumado a esto, a pesar de que todos los arbustos se recolectaron con adobe, no todos soportaron el trasplante. Por este motivo, no se pudo establecer la accesión A014.

Cuadro 6. Accesiones de *V. consanguineum* y *V. poasanum* establecidas en la Subestación de Fraijanes de Alajuela.

Accesión	Especie	Sitio de recolección	Arbustos recolectados	Arbustos establecidos
A004	<i>V. poasanum</i>	Cerro de la Muerte	0	0
A006	<i>V. consanguineum</i>	Cerro de la Muerte	7	4
A007	<i>V. consanguineum</i>	Cerro de la Muerte	8	5
A012	<i>V. consanguineum</i>	Volcán Poás	6	4
A013	<i>V. consanguineum</i>	San Gerardo de Dota	4	3
A014	<i>V. consanguineum</i>	San Gerardo de Dota	2	0
A015	<i>V. consanguineum</i>	San Gerardo de Dota	6	5
A018	<i>V. consanguineum</i>	Volcán Irazú	5	3
A019	<i>V. consanguineum</i>	Volcán Irazú	7	4
A020	<i>V. poasanum</i>	Volcán Poás	0	0
A021	<i>V. poasanum</i>	Volcán Poás	13	12
A022	<i>V. poasanum</i>	Cerro de la Muerte	0	0
A023	<i>V. poasanum</i>	Volcán Turrialba	0	0
A024	<i>V. consanguineum</i>	Volcán Turrialba	3	3
Total de arbustos			61	43

Descriptores cuantitativos

En el cuadro 7 se muestra la caracterización morfológica efectuada a la colección de accesiones de arándano silvestre ubicada en la Subestación de Fraijanes de Alajuela. La altura de la planta se encuentra entre 38 y 88,7 cm y el grosor del tallo entre 6,7 y 18,2 mm. El espesor de la hoja varía entre 0,3 y 0,4 mm, el ancho entre 7,6 y 11,8 mm, y la longitud entre 18,2 y 28,4 mm. El grosor de brotes florales varía entre 1,1 y 2,1 mm y el de los brotes vegetativos entre 1,3 y 1,6 mm.

Cuadro 7. Datos promedio de los descriptores cuantitativos evaluados *ex situ* de accesiones de la especie *V. consanguineum*.

Accesión	Altura de la planta (mm)	Grosor del tallo (mm)	Grosor de la hoja (mm)	Ancho de la hoja (mm)	Longitud de la hoja (mm)	Grosor de los brotes florales (mm)	Grosor de los brotes vegetativos (mm)
A006	76,3 ± 10,9	17,2 ± 3,3	0,3 ± 0,03	9,7 ± 0,6	21,6 ± 1,1	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,1
A007	56,2 ± 12,2	12,1 ± 1,3	0,3 ± 0,00	9,1 ± 0,4	18,2 ± 0,6	1,4 ± 0,04	1,3 ± 0,2
A012	38,0 ± 4,8	9,8 ± 2,2	0,3 ± 0,05	10,4 ± 0,5	23,7 ± 1,2	-	1,5 ± 0,1
A013	75,3 ± 6,4	17,2 ± 6,3	0,3 ± 0,03	11,2 ± 0,1	27,1 ± 0,1	1,5 ± 0,03	1,3 ± 0,1
A015	51,4 ± 6,1	6,7 ± 0,6	0,3 ± 0,02	11,8 ± 0,4	28,4 ± 0,5	-	1,4 ± 0,1
A018	72,3 ± 17,5	20,9 ± 1,2	0,3 ± 0,03	7,6 ± 0,6	19,7 ± 0,6	2,1 ± 0,1	-
A019	73,3 ± 13,1	13,2 ± 1,2	0,4 ± 0,03	8,6 ± 0,7	23,5 ± 1,1	-	1,6
A024	88,7 ± 17,7	18,2 ± 0,9	0,4 ± 0,03	10,3 ± 0,3	22,5 ± 0,4	-	-

* Valor promedio ± Error estándar

La A021 es la única accesión de la especie *V. poasanum* de la cual se pudo encontrar plantas con alturas inferiores a 1,5 m y por tanto la única que se logró establecer en la Subestación de Fraijanes y ser caracterizada *ex situ*. En el cuadro 8 se muestran los valores promedio de los descriptores cuantitativos evaluados *ex situ* para esta accesión.

Cuadro 8. Datos promedio de los descriptores cuantitativos evaluados *ex situ* de una accesión (12 plantas) de la especie *V. poasanum*.

Accesión	Altura planta (mm)	Grosor tallo (mm)	Grosor de hoja (mm)	Ancho de hoja (mm)	Longitud de hoja (mm)	Grosor brotes vegetativos (mm)
A021	37,2 ± 6,1	7,0 ± 0,9	0,6 ± 0,03	29,6 ± 1,1	47,2 ± 1,6	1,5 ± 0,2

* Valor promedio ± Error estándar

Descriptores cualitativos

En cuanto a los caracteres cualitativos, se observó que al igual que en la caracterización morfológica *in situ*, no hubo variabilidad entre las accesiones de cada especie. Por tal motivo, no se efectuó ningún tipo de análisis estadístico. En la figura 3 se observan arbustos de *V. consanguineum* y *V. poasanum* después de 6 meses de haber sido trasplantados en la Subestación de Fraijanes.



Figura 3. Plantas de *V. consanguineum* (a) y *V. poasanum* (b) luego de 6 meses de establecidas en la Subestación de Fraijanes de Alajuela.

Germinación de semillas

Como se aprecia en el cuadro 9, el tratamiento con el cual se logró un mayor porcentaje de germinación y de plántulas establecidas *in vitro* para la especie *V. consanguineum* fue la inmersión de las semillas en una solución de ácido giberélico a 1000 mg/L durante 12 horas; mientras que para *V. poasanum* fue el medio MS suplementado con 50 mg/L de este regulador de crecimiento. En la primera especie se alcanzó hasta un 42,6% de germinación y un 32,7% de vitroplantas establecidas y para la especie *V. poasanum* el mayor porcentaje de germinación fue 16% y un 7% de vitroplantas establecidas.

Para *V. poasanum* se pudo observar que a mayor concentración del regulador, el porcentaje de germinación fue menor. En *V. consanguineum* no hubo germinación cuando las semillas se dejaron en inmersión a 500 mg/L durante 12 horas. Esto se puede atribuir a que el lote de semilla empleado estuvo en almacenamiento por un periodo de un mes, a diferencia de los demás tratamientos en los cuales se utilizó semilla fresca.

Cuadro 9. Porcentajes de germinación y plántulas establecidas *in vitro* de dos especies de arándano silvestre cuyas semillas fueron embebidas en soluciones de diferentes concentraciones de GA₃.

Concentración (mg/L)	<i>V. consanguineum</i>		<i>V. poasanum</i>	
	% Germinación	% Plántulas establecidas	% Germinación	% Plántulas establecidas
0	0,0	0,0	0,0	0,0
50	22,3 ± 1,8	17,4 ± 1,4	16,0 ± 1,3	7,0 ± 0,9
500	0,0	0,0	9,2 ± 1,2	5,2 ± 0,5
1000	42,6 ± 2,7	32,7 ± 2,1	1,6 ± 0,3	1,6 ± 0,4

En las figuras 4 y 5 se presentan los estadios de germinación y desarrollo de ambas especies de arándano silvestre. Es a partir del estadio 7 que se empieza desarrollar la planta verdadera. La diferencia que existe entre el porcentaje de germinación y de plántulas establecidas es debida al porcentaje de semillas germinadas que no logró sobrevivir a este estadio. En el estadio 11, se observa una plántula con 12 semanas de haber sido subcultivada a medio de WPM suplementado con 0,5 mg/L de Zeatina.

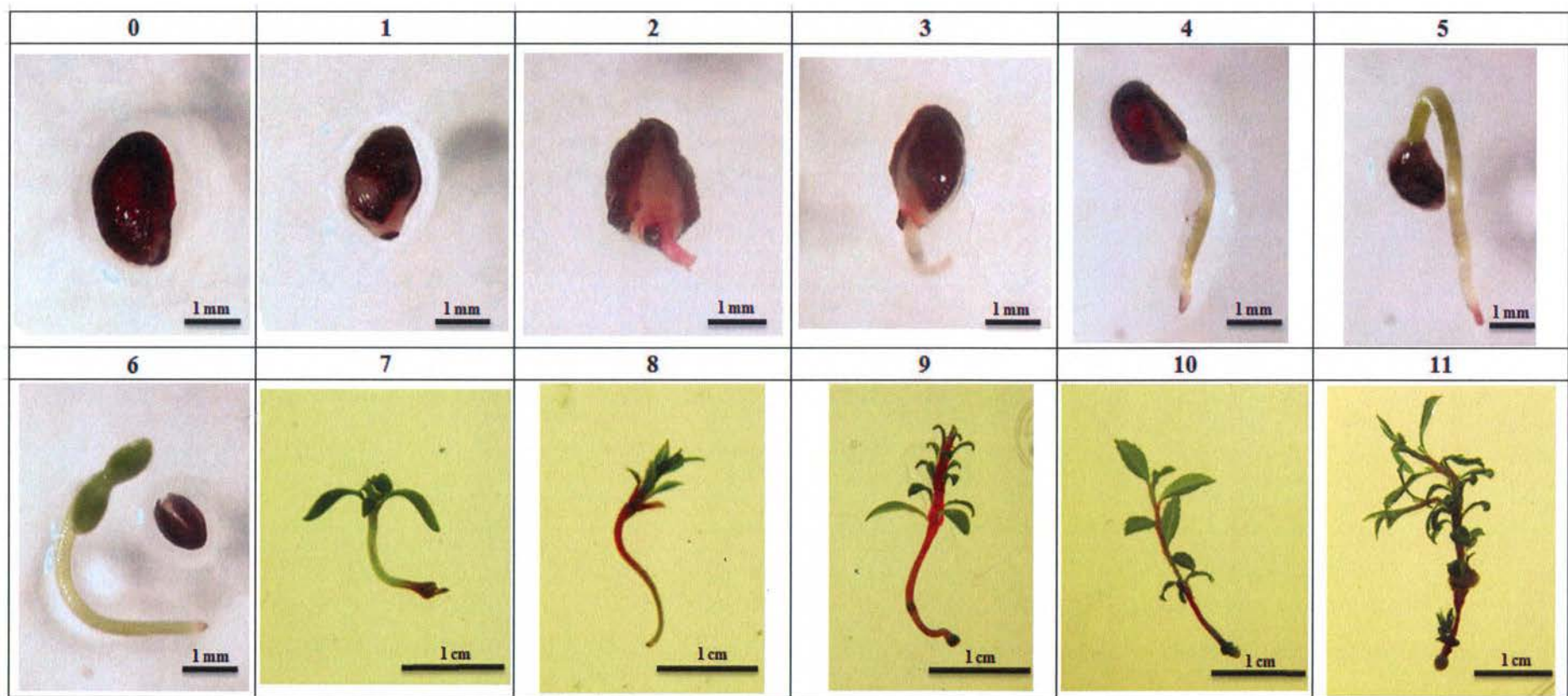


Figura 4. Estadios en la germinación de semillas y crecimiento de plantas establecidas *in vitro* de *V. consanguineum*.

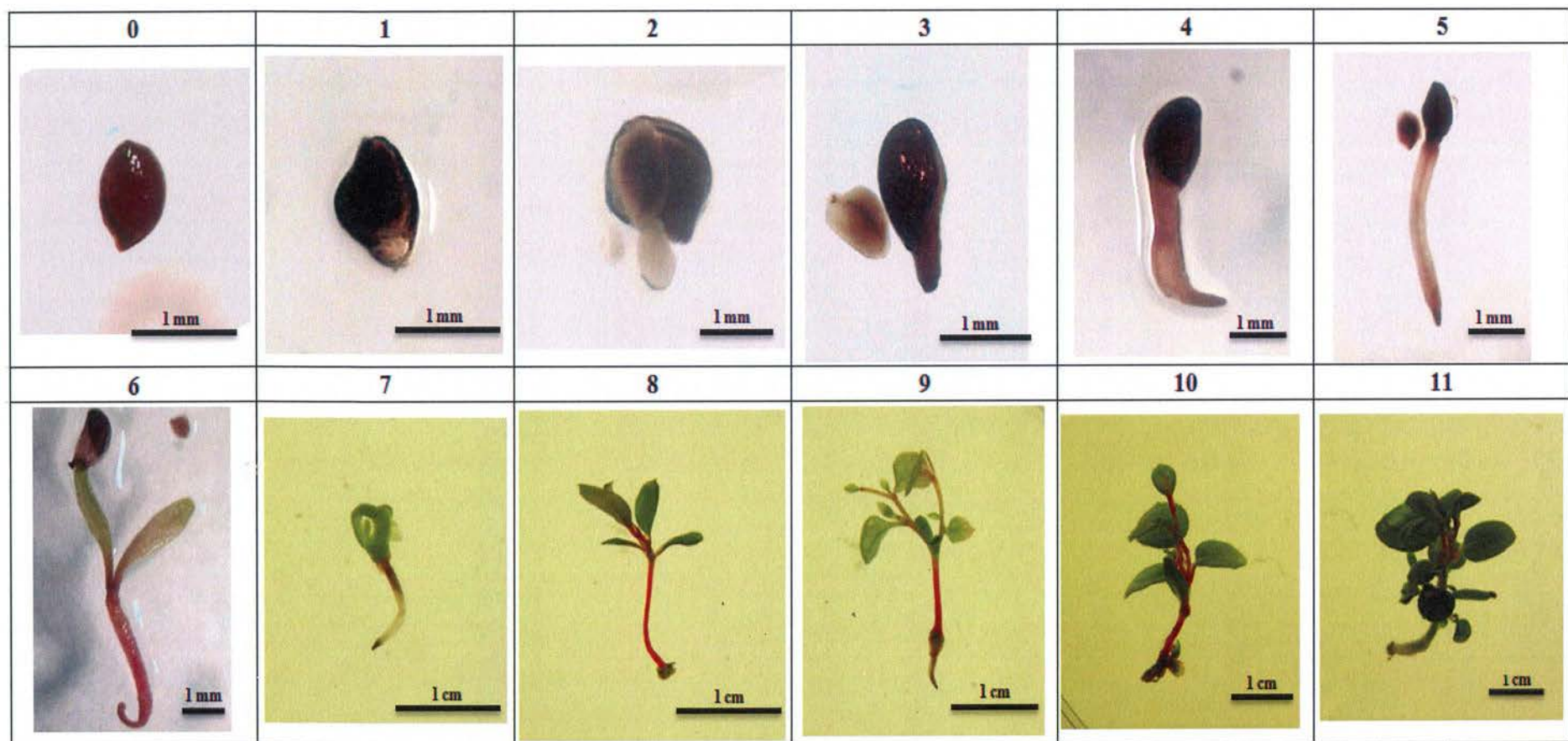


Figura 5. Estadios en la germinación de semillas y crecimiento de plantas establecidas *in vitro* de *V. poasanum*.

Efecto de agentes antimitóticos sobre dos especies de arándano silvestre de Costa Rica

Inicialmente, se realizaron pruebas preliminares con colchicina y orizalina en dos accesiones de la especie *V. consanguineum* y en una de *V. poasanum* para determinar el grado de oxidación que pudiera presentarse. Estas pruebas se realizaron inoculando brotes de 1 cm de longitud en medio WPM sólido suplementado con las concentraciones de agentes antimitóticos indicadas en el cuadro 10 y se mantuvieron en este medio durante 10 días. De acuerdo a Lan y Shan (2007); Głowacka *et al.* (2009) y Nadler *et al.* (2012), se obtienen mejores resultados de duplicación cromosómica al usar medio líquido, por lo que se decidió continuar los tratamientos en medio líquido con agitación constante.

En estas pruebas se determinó primeramente si se presentaba oxidación de los explantes y, posteriormente la ploidía por medio de citometría de flujo. Se pudo observar que la orizalina a 3 mg/L indujo un tetraploide en las accesiones A007 y A020 y un mixoploide en la A015. El tratamiento de colchicina a 228 mg/L produjo un 50% de duplicación cromosómica en las accesiones de *V. consanguineum* evaluadas. En las pruebas con medio líquido con orizalina y con la especie *V. poasanum*, todos los explantes se oxidaron y murieron, mientras que con colchicina se obtuvo un mixoploide y un 100% de sobrevivencia. (anexo 4).

Cuadro 10. Número de diploides, mixoploides y tetraploides obtenidos en *V. consanguineum* (A007 y A015) y *V. poasanum* (A023) con la aplicación de distintas concentraciones de colchicina y orizalina a diferentes tiempos de exposición.

Accesión	Tratamiento	Tiempo de exposición (días)	No. explantes tratados	% de Supervivencia	No. explantes analizados	Ploidía		
						No. diploides	No. Mixoploides	No. tetraploides
A007	Testigo	10	10	100	2	2 (100)	0 (0)	0 (0)
A007	Orizalina 3 mg/L	10	10	100	2	1 (50)	1 (50)	0 (0)
A007	Colchicina 228 mg/L	10	10	100	2	0 (0)	1 (50)	1 (50)
A015	Testigo	10	10	100	2	2 (100)	0 (0)	0 (0)
A015	Orizalina 3 mg/L	10	10	100	2	0 (0)	1 (50)	1 (50)
A015	Colchicina 228 mg/L	10	10	100	2	1 (50)	0 (0)	1 (50)
A023	Testigo	10	10	100	2	2 (100)	0 (0)	0 (0)
A023	Orizalina 3 mg/L	10	10	100	2	1 (50)	0 (0)	1 (50)
A023	Orizalina 50 mg/L	4	10	0	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)
A023	Colchicina 50 mg/L	4	10	100	2	1 (50)	1 (50)	0 (0)

En el cuadro 11 se muestran los resultados de análisis de citometría de flujo de los tratamientos aplicados a los explantes con colchicina a tres distintas concentraciones (50, 100 y 150 mg/L) y tres tiempos de exposición (24, 48 y 96 horas) en dos accesiones de *V. consanguineum*. A las vitroplantas analizadas se les determinó el nivel de ploidía y se

clasificaron como diploides, mixoploides y tetraploides comparándolas contra un testigo de ploidía conocida (vitroplanta diploide). En los anexos 6, 7 y 8 se muestran ejemplos de los análisis obtenidos.

Para la especie *V. poasanum* no fue posible aplicar los tratamientos debido a la falta de semilla cuando se inició esta investigación, a la pobre germinación que presentaron las semillas que se colectaron posteriormente y su lenta respuesta en condiciones de cultivo *in vitro*. Para esta especie solo fue posible realizar las pruebas que se presentaron en el cuadro 10.

En el cuadro 11 se puede observar que, con la colchicina se obtuvo solo un tetraploide en la accesión A015 con el tratamiento de 150 mg/L durante 48 horas. Sin embargo, en explantes de la accesión A007, se obtuvo varios mixoploides en los tratamientos con 50 mg/L durante 24 horas, 100 mg/L 96 horas, 150 mg/L 48 horas y 150 mg/L por 96 horas y para la accesión A015 con los tratamientos de 100 mg/L por 24, 48 y 96 horas y 150 mg/L por 24 y 96 horas.

Las vitroplantas de los tratamientos que resultaron tetraploides o mixoploides presentaron ciertas características visiblemente distintas al testigo, como la coloración y el grosor de las hojas, y tricomas más visibles (anexos 5 y 6). La estabilidad de la ploidía de dichas vitroplantas debe corroborarse con análisis posteriores de citometría de flujo.

Cuadro 11. Número de explantes diploides, mixoploides y tetraploides inducidos con diferentes concentraciones y tiempos de exposición a colchicina en dos accesiones de *V. consanguineum* (A007 y A015).

Accesión	Tratamiento	Tiempo de exposición (h)	No. explantes tratados	% de Supervivencia	No. explantes analizados	Ploidía		
						No. diploides	No. mixoploides	No. Tetraploides
A007	Testigo	24	40	100	8	8 (100)	0 (0)	0 (0)
		48	40	100	8	8 (100)	0 (0)	0 (0)
		96	40	100	8	8 (100)	0 (0)	0 (0)
	Colchicina 50 mg/L	24	40	90	7	6 (86)	1 (14)	0 (0)
		48	40	95	7	7 (100)	0 (0)	0 (0)
		96	40	100	7	7 (100)	0 (0)	0 (0)
	Colchicina 100 mg/L	24	40	100	7	7 (100)	0 (0)	0 (0)
		48	40	100	7	7 (100)	0 (0)	0 (0)
		96	40	97	7	4 (57)	3 (43)	0 (0)
	Colchicina 150 mg/L	24	40	100	6	6 (100)	0 (0)	0 (0)
		48	40	95	6	7 (100)	1 (0)	0 (0)
		96	40	87	7	6 (86)	1 (14)	0 (0)
A015	Testigo	24	40	100	8	8 (100)	0 (0)	0 (0)
		48	40	100	8	8 (100)	0 (0)	0 (0)
		96	40	100	8	8 (100)	0 (0)	0 (0)
	Colchicina 50 mg/L	24	40	100	6	6 (100)	0 (0)	0 (0)
		48	40	100	7	7 (100)	0 (0)	0 (0)
		96	40	100	6	6 (100)	0 (0)	0 (0)
	Colchicina 100 mg/L	24	40	97	8	7 (88)	1 (13)	0 (0)
		48	40	97	6	5 (83)	1 (17)	0 (0)
		96	40	97	8	7 (88)	1 (13)	0 (0)
	Colchicina 150 mg/L	24	40	97	8	4 (50)	4 (50)	0 (0)
		48	40	95	8	7 (88)	0 (0)	1 (13)
		96	40	97	8	5 (63)	3 (38)	0 (0)

Casi todos los tratamientos con orizalina (cuadro 12), indujeron la formación de autoploiploides en ambas accesiones de la especie *V. consanguineum*. Para la accesión A007 solo los tratamientos con 100 mg/L a 24, 48 y 96 horas y 150 mg/L a 24 y 48 horas no indujeron la duplicación cromosómica y tampoco para la accesión A015 con los tratamientos de 75 mg/L por 24 horas y 150 mg/L por 24 horas.

De los tratamientos aplicados, el único que produjo un 100% de duplicación cromosómica fue el de orizalina a 25 mg/L por 96 horas para la accesión A007; mientras que para la accesión A015 el mayor porcentaje de duplicación cromosómica con orizalina fue de un 67% con los tratamientos a 25 mg/L por 96 horas, a 75 mg/L por 48 horas, a 100 mg/L por 24 y 96 horas y a 150 mg/L por 96 horas.

Con este agente antimitótico también se indujo la formación de vitroplantas mixoploides en casi todos los tratamientos. Para la accesión A007, con los tratamientos a 25 mg/L durante 96 horas, 75 mg/L durante 24 horas, 100 mg/L durante 96 horas y 150 mg/L durante 24 horas no se obtuvieron poliploides y tampoco para la accesión A015 con los tratamientos a 50 mg/L durante 96 horas, 100 mg/L durante 48 horas y a 150 mg/L durante 96 horas.

Cuadro 12. Número de diploides, mixoploides y tetraploides inducidos con distintas concentraciones y tiempos de exposición de orizalina en dos accesiones de *V. consanguineum* (A007 y A015).

Accesión	Tratamiento	Tiempo de exposición (h)	No. explantes tratados	% de Supervivencia	No. explantes analizados	Ploidía		
						No. diploides	No. mixoploides	No. Tetraploides
A007	Testigo	24	40	100	8	8 (100)	0 (0)	0 (0)
		48	40	100	8	8 (100)	0 (0)	0 (0)
		96	40	100	8	8 (100)	0 (0)	0 (0)
	Orizalina 25 mg/L	24	20	85	3	0 (0)	2 (67)	1 (33)
		48	20	100	3	0 (0)	1 (33)	2 (67)
		96	20	75	4	0 (0)	0 (0)	4 (100)
	Orizalina 50 mg/L	24	40	92	7	1 (14)	4 (57)	2 (29)
		48	40	80	8	1 (13)	4 (50)	3 (38)
		96	40	80	8	2 (25)	4 (50)	2 (25)
	Orizalina 75 mg/L	24	20	70	3	1 (33)	0 (0)	2 (67)
		48	20	90	4	0 (0)	2 (50)	2 (50)
		96	20	100	4	0 (0)	3 (75)	1 (25)
	Orizalina 100 mg/L	24	20	90	4	1 (25)	3 (75)	0 (0)
		48	20	65	4	2 (50)	2 (50)	0 (0)
		96	20	65	4	4 (100)	0 (0)	0 (0)
	Orizalina 150 mg/L	24	20	75	3	3 (100)	0 (0)	0 (0)
		48	20	55	3	2 (67)	1 (33)	0 (0)
		96	20	45	3	0 (0)	2 (67)	1 (33)
A015	Testigo	24	40	100	8	8 (100)	0 (0)	0 (0)
		48	40	100	8	8 (100)	0 (0)	0 (0)
		96	40	100	8	8 (100)	0 (0)	0 (0)
	Orizalina 25 mg/L	24	20	95	4	0 (0)	3 (75)	1 (25)
		48	20	90	3	0 (0)	2 (67)	1 (33)
		96	20	60	3	0 (0)	1 (33)	2 (67)
	Orizalina 50 mg/L	24	40	50	5	1 (20)	3 (60)	1 (20)
		48	40	45	4	0 (0)	3 (75)	1 (25)
		96	40	62	3	2 (67)	0 (0)	1 (33)
	Orizalina 75 mg/L	24	20	100	4	1 (25)	3 (75)	0 (0)
		48	20	80	3	0 (0)	1 (33)	2 (67)
		96	20	100	4	0 (0)	2 (50)	2 (50)
	Orizalina 100 mg/L	24	20	80	3	1 (33)	0 (0)	2 (67)
		48	20	70	4	0 (0)	2 (50)	2 (50)
		96	20	45	3	0 (0)	1 (33)	2 (67)
	Orizalina 150 mg/L	24	20	65	4	1 (25)	3 (75)	0 (0)
		48	20	30	4	0 (0)	2 (50)	2 (50)
		96	20	65	3	1 (33)	0 (0)	2 (67)

Como se mencionó anteriormente, tanto en los tratamientos en los que se utilizó orizalina, como en los que se aplicó colchicina, cuando se obtuvieron tetraploides y mixoploides, estos presentaron características visiblemente distintas al testigo (anexos 7 y 8). También en estos casos se necesita determinar la estabilidad de estas vitroplantas, ya sea a través de conteo de tricomas, número de cloroplastos en las células guarda, densidad estomática o tamaño de la hoja y citometría de flujo (Wannakrairoj y Tefera 2013).

Para analizar el porcentaje de sobrevivencia de los explantes tratados se utilizó el programa SAS Studio que realiza comparaciones entre pares de tratamientos. Se puede observar en el cuadro 13, que hubo diferencia significativa en el tiempo y en la relación tiempo por tratamiento.

Como se aprecia en el cuadro 14, no se determinó diferencias significativas entre los tratamientos con colchicina en ninguna de las accesiones evaluadas. En los tratamientos con orizalina solo se presentaron diferencias significativas entre tres pares de tratamientos para las dos accesiones de *V. consanguineum*: 25 mg/L de orizalina por 48 horas con 25 mg/L de orizalina por 96 horas, 100 mg/L de orizalina por 24 horas con 100 mg/L de orizalina por 96 horas y 150 mg/L de orizalina por 24 horas con 150 mg/L de orizalina por 48 horas. Sin embargo, se debe considerar que en los tratamientos con 100 y 150 mg/L de orizalina se presentó precipitación del agente después de 24 horas de iniciado el tratamiento.

Cuadro 13. Análisis de modelos mixtos mediante el programa SAS Studio para el porcentaje de supervivencia en explantes tratados con dos agentes antimicrobianos a tres tiempos de exposición y en dos accesiones de *V. consanguineum*.

Factor	p-valor
Accesión	0,1987
Tratamiento (mg/L)	0,4319
Accesión *Tratamiento (mg/L)	0,4422
Tiempo (h)	<0,0001
Accesión *Tiempo (h)	0,4103
Tiempo (h) *Tratamiento (mg/L)	<0,0001
Accesión *Tiempo (h) *Tratamiento (mg/L)	0,1909

Cuadro 14. Tratamientos con dos agentes antimicrobianos a tres tiempos de exposición y para dos accesiones de *V. consanguineum* que resultaron significativamente diferentes entre sí con el análisis de modelos mixtos mediante el programa SAS Studio ($\alpha = 5\%$).

Comparación	Tratamiento (mg/L)	Tiempo (h)	Tratamiento (mg/L)	Tiempo (h)	Estimado	p-valor
1	25 de orizalina	48	25 de orizalina	96	27,5	0,0002
2	100 de orizalina	24	100 de orizalina	96	30	<0,0001
3	150 de orizalina	24	150 de orizalina	48	27,5	0,0002

DISCUSIÓN

Identificación de las especies de arándano silvestre

Al igual que en otros cultivos, en arándano existen especies que poseen gran similitud entre sí a nivel de género, tal es el caso de las especies *V. consanguineum* y *V. floribundum*. Entre dichas especies solo existen cuatro características morfológicas por las cuales se pueden diferenciar: el porte de la planta, la longitud del raquis y del pedicelo y por los estambres con los conectivos con espolones vestigiales. Con respecto al porte de la planta, la primera especie se presenta como árboles o arbustos que pueden alcanzar los 15 m de altura; mientras que la segunda son hierbas sufrutescentes o arbustos de hasta 6 m (Hammel *et al.* 2010). Sin embargo, según Lagos *et al.* (2010) esta última no sobrepasa los 2,5 m de altura. El raquis de la inflorescencia mide de 1 a 4 cm en la primera y hasta casi 1,5 cm en la segunda y los pedicelos son de 1 a 2 mm en *V. consanguineum* y 1,8 a 5,5 mm en *V. floribundum*. Los estambres de la primera especie, se presentan con los conectivos a veces con espolones vestigiales que miden entre 0,2 y 0,6 mm; mientras que la segunda no posee espolones (Hammel *et al.* 2010). Según Luteyn y Wilbur (2005), ambas especies poseen anteras con estípulas o estípulas vestigiales. Sin embargo, las poblaciones de *V. floribundum* presentes en el país carecen de éstas.

Aun así, y de acuerdo a la literatura consultada, ha sido difícil determinar la taxonomía de algunas especies del género *Vaccinium*. Esto se debe a la poliploidía natural presente, morfologías superpuestas, falta de diferenciación cromosómica y cruces entre secciones, lo

cual podría dificultar aún más la determinación de una especie como tal. Este es el caso de *V. corumbosum* y *V. oxycoccos*, para las cuales se ha demostrado que, además de que son especies genéticamente autoploidoides, en esta última especie se han encontrado genes de *V. macrocarpon*. Se ha comprobado también la existencia de híbridos interespecíficos entre *V. darrowii* Camp y *V. corymbosum* y entre *V. vitis-idaea* y *V. myrtillus*. Esto origina la gran variabilidad morfológica observada dentro de las especies y podría ser la explicación del porqué no se pueden distinguir con facilidad en muchos casos (Hammel *et al.* 2010, Hancock *et al.* 2008, Rowland *et al.* 2011). Adicionalmente, las especies silvestres de arándano de las regiones tropicales son poco conocidas y por tanto se requieren más estudios en botánica y genética molecular que proporcionen la información necesaria para su adecuada identificación (Song y Hancock 2011).

En el caso de la especie *V. poasanum*, se ha demostrado que posee cierta similitud con *V. furfuraceum*, otra de las especies de arándano silvestre presentes en el país. Sin embargo, la característica que las diferencia es sencilla de identificar y por tanto fácil de reconocer. *V. furfuraceum* posee un indumento canescente o furfuráceo en tallos y corola; mientras que *V. poasanum* no. Por este motivo y a diferencia de en la especie *V. consanguineum*, no se presentó ninguna dificultad para identificarla y reconocerla en campo (Hammel *et al.* 2010).

En Costa Rica, las especies de la familia Ericaceae se caracterizan por ser buenas pioneras y oportunistas. Por tal motivo, se pueden localizar a orillas de carreteras y de bosques, como epífitas en árboles remanentes de pastizales o en zonas de reforestación o en áreas en

donde ocurrió algún evento natural o humano que produjera un sitio poco poblado y con sombra parcial. Son además, plantas que se encuentran a más de 1200 m.s.n.m., como se observó para las accesiones de ambas especies colectadas para esta investigación (Luteyn y Wilbur 2005).

Aun así, una vez que el área comienza a ser colonizada por vegetación más agresiva, dichas especies dejan de florecer o lo hacen en menor medida debido a que quedan sombreadas. Esto se debe a que las plantas de la familia Ericaceae del neotrópico son heliófilas, es decir que pueden soportar condiciones de sombra pero no son capaces de florecer y producir frutos. Esta puede ser una razón por la cual la recolecta de semilla se dificultó en un principio, especialmente en la especie *V. poasanum* (Luteyn y Wilbur 2005, Luteyn 2002).

Caracterización morfológica

La caracterización morfológica es el primer paso del mejoramiento genético de un cultivo y de su programa de conservación. Permite estudiar la variabilidad genética, identificar una especie y conservar los recursos genéticos (Hernández 2013).

Caracterización morfológica *in situ*

Para las dos especies recolectadas, Hammel *et al.* (2010) y Luteyn y Wilbur (2005) describieron altura de planta, longitudes y anchos de hoja y diámetro de frutos. De acuerdo a ellos, la longitud de hoja de *V. poasanum* varía de 30 a 100 mm con un ancho entre 10 y 60 mm, el diámetro de los frutos oscila entre 7 y 10 mm y las plantas pueden tener una altura entre 1 y 10 m. En el caso de *V. consanguineum*, mencionan que altura de planta

varía entre 1 y 15 m, la longitud de hoja entre 15 y 55 mm, el ancho de de hoja entre 5 a 12 mm y el diámetro de fruto entre 5 y 6 mm. Para ambas especies estas variables concuerdan con los datos obtenidos; excepto en el diámetro de los frutos de *V. consanguineum* que puede ser de hasta 9 mm de diámetro. Con respecto a los demás caracteres cuantitativos, no se encontraron datos reportados con los cuales se pudiera efectuar una comparación. Aun así, se puede observar que existe gran variabilidad entre accesiones de cada especie en cada uno de los descriptores cuantitativos evaluados, lo cual es de enorme importancia debido a que se podrían seleccionar los materiales que posean determinadas características de interés. De este modo, estos materiales podrían ser empleados para que sean domesticados y comerciables o para mejorar variedades comerciales como se ha realizado en diversos cultivos (Contreras 2008, Hajjar y Hodgkin 2007, Ford *et al.* 2011).

A manera de ejemplo, se podría seleccionar la accesión A013 de la especie *V. consanguineum*, la cual muestra un promedio de diámetro de fruto de 9,2 mm y una concentración de sólidos solubles de 14 ° Brix. Si ésta es tratada con agentes antimicrobianos, y según Otto y Whitton (2000), se podría esperar que el tamaño del fruto incremente y llegue a ser similar al de una variedad comercial (18 mm) pero con una concentración de sólidos solubles aun mayor; ya que esta última posee aproximadamente 12 ° Brix. Sumado a esto, se debe recordar que esta especie silvestre posee mayor cantidad de polifenoles que las variedades comerciales, lo cual aumenta su uso potencial (Lila *et al.* 2014. Skupień 2006, Ávila *et al.* 2007).

Análisis de correlación

Para efectuar un adecuado análisis de correlación se requiere un mínimo de 10 plantas por accesión o 5 plantas con dos repeticiones. Se recomienda además, que se efectúe en condiciones y lotes homogéneos, es decir que se recolecten arbustos, se trasplanten y se realice una caracterización *ex situ*. Como en este caso no se logró obtener la cantidad mínima necesaria, se efectuó un análisis de correlación general por especie con los datos obtenidos *in situ*. Esto con el propósito de tener un análisis preliminar por especie y que pueda ser de utilidad al compararlo con estudios posteriores (González 2003, Hernández 2013, Ligarreto *et al.* 1998).

El coeficiente de correlación de Pearson determina el grado de asociación lineal que existe entre dos variables cuantitativas con valores entre -1 y 1; en donde los valores cercanos a 1 implican una correlación positiva, cercanos a -1 una negativa y próximos a 0 que no existe asociación lineal entre los descriptores. Se considera que un coeficiente de correlación superior a 0,3 pero inferior a 0,5 es débil, entre 0,5 y 0,7 es moderado y superior a 0,7 es fuerte. En este caso, todas los coeficientes de correlación moderados y fuertes fueron estadísticamente significativos ($p < 0,01$) excepto la asociación entre Grados Brix (°Brix) y longitud de hoja para la especie *V. poasanum*, por lo cual no se tomó en consideración. Se debe tomar en cuenta que este es un análisis de correlación preliminar (Pita y Pértega 2001, Sábado 2010, Taylor 1990).

Para la especie *V. consanguineum*, se determinó correlaciones entre el número de flores por rama y la longitud de la hoja y el peso de 10 frutos con los descriptores de hoja. De modo que posteriormente se podría evaluar si una hoja más grande implicará un aumento en la cantidad de flores por rama y en el peso de los frutos.

Por otro lado, para la especie *V. poasanum* se obtuvo solo una correlación de interés entre el diámetro de los frutos con la concentración de sólidos solubles. En un posterior análisis de correlación se podría determinar si esta correlación se presenta y si al incrementar el tamaño del fruto se aumenta la concentración de sólidos solubles, probablemente por una mayor acumulación de asimilados.

Se debe considerar que un análisis de correlación no necesariamente implica causalidad entre descriptores morfológicos. Esto implica que un coeficiente de correlación puede mostrar una relación falsa o que puede deberse a un conjunto de interacciones entre diversas variables. Por lo que se debe interpretar si la correlación obtenida posee significancia biológica o si es de interés agronómico. Por esta razón, debieron descartarse algunas correlaciones. Un posterior análisis de correlación podría confirmar las asociaciones que se presentaron (Pita y Pértega 2001, Sábado 2010).

Caracterización morfológica *ex situ*

En la caracterización morfológica *ex situ* se determinó que, aunque las accesiones de ambas especies de arándano ya se encuentran ubicadas y establecidas en un mismo sitio, la variabilidad se mantiene entre éstas. Esto se denota en los descriptores de ancho, grosor y

longitud de hoja y grosor de brotes vegetativos y florales. Lo cual es de gran importancia debido a que, como ya se mencionó, se podría efectuar una selección de materiales ya sea para realizar mejoramiento genético en el cultivo del arándano o para domesticar y comercializar accesiones de las especies silvestres evaluadas (Prodorutti *et al.* 2007, Hajjar y Hodgkin 2007, Ford *et al.* 2011). Los descriptores de altura de la planta y grosor de tallo no se tomaron en cuenta por tratarse de plantas que no se encuentran cultivadas y que presentan edades cronológicas y fisiológicas distintas entre sí, lo cual pudo haber interferido con los resultados.

Germinación de semillas

En la literatura no se reportan porcentajes de germinación de semillas ni técnicas de propagación asexual o sexual para las especies *V. consanguineum* y *V. poasanum* o su interés para el mejoramiento genético. Sin embargo, sí se ha documentado el uso de otras especies silvestres para el mejoramiento genético del cultivo del arándano. *V. floribundum* y *V. meridionale* por ejemplo, son dos especies silvestres que se encuentran dentro del Trópico de Cáncer y que muestran gran similitud anatómica, la cual es aplicable a nivel de género, por lo que en este estudio se compararon los porcentajes de germinación obtenidos con los de estas especies (Bell 1957, Luteyn y Wilbur 2005, Song y Hancock 2011).

Con respecto a la germinación de semillas, para *V. floribundum* Muñoz (2004), logró obtener hasta un 95% de germinación en medio MS. Sin embargo, no fue posible el desarrollo de las vitroplantas ya que, a pesar de tratarlas con distintos reguladores de

crecimiento, nunca se desarrollaron. En nuestra investigación, no se obtuvieron porcentajes de germinación tan altos, pero si se logró el desarrollo de las plántulas, la multiplicación de estas y por consiguiente, su propagación *in vitro*, tanto para *V. consanguineum* como para *V. poasanum*. En otros ensayos realizados por González (2002), con *V. floribundum* se obtuvo un porcentaje de germinación de 23,4% en condiciones de laboratorio y a 20 °C. En nuestro caso el porcentaje de germinación más alto para *V. consanguineum* fue de 42,6% y solamente de un 16,0% para *V. poasanum*.

En cuanto a la intensidad lumínica, se ha documentado que especies como *V. meridionale* poseen una respuesta fotoblástica positiva a la luz y que por tanto germinan mejor en condiciones lumínicas que en oscuridad. Según lo reportado, la temperatura utilizada también se encuentra dentro del rango óptimo de germinación para este género, pero se menciona que la germinación es mayor a 20 °C que a 25 °C. En este estudio, la temperatura que se utilizó fue de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Hernández *et al.* 2009, Baskin *et al.* 2000, Silvertown 1999).

El ácido giberélico es un regulador de crecimiento que está involucrado en distintos procesos de desarrollo en plantas. Algunos de sus efectos fisiológicos son la inducción del crecimiento de la planta, promoción del desarrollo de inflorescencias y la floración, fomento la germinación en semillas que presentan dormancia, influye en la determinación del sexo y está involucrado en el cuaje de frutos. En este caso, se empleó con el propósito de homogenizar y acelerar la germinación en semillas de las especies de arándano silvestre objeto de este estudio (Jordan y Casaretto 2006, Taiz y Zeiger 2007).

La existencia de latencia en semillas de ambas especies silvestres de arándano se demuestra al observar el efecto de los tratamientos con ácido giberélico. El uso del ácido giberélico incrementó el porcentaje de germinación de las semillas en comparación con el del testigo. Este efecto se apreció tanto en el tratamiento con 50 mg/l como con 1000 mg/L de ácido giberélico para *V. consanguineum* y 50 mg/L para *V. poasanum*. En otras investigaciones también se ha observado efectos similares. Según Hernández *et al.* (2009), en la especie *V. meridionale* se obtuvo un 98% de germinación al embeber las semillas en una solución de 1000 mg/L de GA₃ durante 24 horas. En *Penstemon digitalis* cv. Husker Red se comprobó que con esta misma concentración se indujo el mayor porcentaje de germinación en esta especie (Machado *et al.* 2009).

Con la especie *V. poasanum* se observó un efecto detrimental en la germinación al aumentar la concentración del ácido giberélico. A pesar de ello si se logró aumentar el porcentaje de germinación con el uso de ácido giberélico en comparación con el control.

En *V. consanguineum* no se observó germinación con el tratamiento de 500 mg/L de ácido giberélico. Se debe considerar que el lote de semilla utilizado para este tratamiento se mantuvo en almacenamiento por un mes, a diferencia del resto de los tratamientos en los que se usó semilla fresca. Con semilla fresca se hace referencia a un lote de semilla que no fue almacenada a 4 °C sino que fue inoculada de manera inmediata a su extracción y limpieza.

Según Castro *et al.* (2012), se estimula una mayor tasa de germinación de semillas de *V. meridionale*, en condiciones de laboratorio, cuando éstas permanecen almacenadas de 1 a 7 días a temperatura ambiente. Cuando se almacenan por más tiempo, el porcentaje de germinación disminuye de 72,6% a 37,5% en solo 4 semanas por la pérdida de viabilidad.

En otro estudio realizado por Magnitskiy y Ligarreto (2007), se determinó que el porcentaje de germinación de semillas de *V. meridionale* almacenadas a 5 °C por 35 días se redujo a un 38%. Se puede asumir entonces, que el periodo de tiempo en el cual se mantuvo en almacenamiento el lote de semilla empleado para el tratamiento de 500 mg/L, pudo haber afectado el porcentaje de germinación por disminución de su viabilidad.

Por otro lado Hernández *et al.* (2009) y Hernández *et al.* (2012) consideran que las semillas de *V. meridionale* parecen ser ortodoxas; ya que pueden ser almacenadas por varios meses o años y toleran la desecación. Las semillas de esta especie se pueden almacenar a -10 °C por 12 meses y presentar todavía un porcentaje de germinación de 60%; mientras que semillas mantenidas a temperatura ambiente y sin un periodo de almacenamiento, presentan un máximo de 76% de germinación. Para *V. consanguineum* y *V. poasanum* no se han efectuado aún pruebas de almacenamiento y germinación después de un período prolongado de almacenamiento, por lo que se desconoce si son semillas que puedan ser ortodoxas o que más bien, por los resultados obtenidos, presenten características de semillas recalcitrantes y por tanto no deban ser almacenadas por más de una semana antes de establecerlas *in vitro* o germinarlas bajo condiciones de invernadero.

Se sugiere volver a efectuar el ensayo de germinación con las concentraciones utilizadas, al menos 5 repeticiones por tratamiento, la misma cantidad de semillas por placa y lote de semilla, sin ser almacenado por más de una semana. De esta forma se podría determinar cuál es el mejor tratamiento para inducir la germinación en estas especies. Aun así, los valores de germinación reportados se pueden utilizar a modo de referencia.

Efecto de agentes antimitóticos sobre el nivel de ploidía de dos especies de arándano silvestre de Costa Rica

Los agentes antimitóticos son sustancias químicas que pueden ocasionar fallas en la mitosis, lo cual induce la formación de células, órganos o plantas con duplicación cromosómica. Estas sustancias evitan que se formen los microtúbulos y por tanto las fibras del huso mitótico, e impide la migración de los cromosomas hijos a los polos opuestos. Por lo tanto no se da la división celular sino que se generan células con el doble del número de cromosomas (Pintos *et al.* 2014, Escandón *et al.* 2007, Glowacka *et al.* 2010, do Valle y Tadeo 2001, Wannakrairoj y Tefera 2013).

En este estudio se trataron brotes de vitroplantas de dos especies de arándano silvestre con dos agentes antimitóticos (colchicina y orizalina) con el propósito de inducir la formación de plantas tetraploides. De forma preliminar se realizaron algunas pruebas con ambos agentes a una sola concentración y a un mismo tiempo de exposición en medio WPM sólido. Posteriormente se cambió la metodología y se decidió efectuar tratamientos en medio WPM líquido debido a que según otros autores (Lan y Shan 2007; Głowacka *et al.*

2009; Nadler *et al.* 2012), con brotes de plantas establecidas *in vitro*, se obtienen mejores resultados de duplicación cromosómica al usar medio líquido. Para este ensayo no fue posible aplicar los posteriores tratamientos con antimitóticos a la especie *V. poasanum* por falta de material (semillas).

Se observó que los tratamientos con colchicina en medio WPM líquido a tres concentraciones (50, 100 y 150 mg/L) y tres tiempos de exposición (24, 48 y 96 horas) no fueron efectivos para generar duplicación cromosómica en la especie *V. consanguineum*. Esto no se puede comprobar estadísticamente debido a que la cantidad de vitroplantas evaluadas por citometría de flujo para cada tratamiento fue escasa. Sin embargo, de los 9 tratamientos empleados con este agente antimitótico en ambas accesiones tratadas, solo se obtuvo un tetraploide. Esto implica que deberían utilizarse concentraciones mayores de colchicina para observar un efecto considerable sobre la poliploidización de las especies utilizadas en este estudio o en su defecto, aumentar los tiempos de exposición de los explantes a este antimitótico. Este efecto, que tampoco se puede confirmar estadísticamente, se observó en las pruebas preliminares. A una concentración mayor (228 mg/L) por un tiempo de exposición de 10 días, de 4 vitroplantas analizadas de la especie *V. consanguineum*, 2 resultaron ser tetraploides. En un estudio realizado por Miyashita *et al.* (2009) se reporta el uso de concentraciones hasta de 2000 mg/L en semillas de *Vaccinium* sp. para fomentar la inducción de plantas con duplicación cromosómica, concentración que supera por mucho las utilizadas para la colchicina en esta investigación.

A diferencia de la colchicina, en este estudio, la orizalina utilizada igualmente a tres concentraciones y tiempos de exposición en medio WPM líquido, produjo un mayor efecto sobre la duplicación cromosómica en casi todos los tratamientos empleados. No se puede argumentar estadísticamente cual fue el mejor tratamiento con este agente debido al bajo número de muestras analizadas. Sin embargo, según Wannakraioj y Tefera (2013), debe elegirse el agente antimitótico que haya provocado el mayor porcentaje de tetraploidía en una concentración baja y un porcentaje de sobrevivencia aceptable. En este estudio, a pesar de que concentraciones de 100 y 150 mg/L de orizalina indujeron duplicación cromosómica, el compuesto tiende a precipitarse a esas concentraciones, por lo que no es recomendable usar concentraciones altas (*PhytoTechnika* 2010). Por tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos, el tratamiento con 25 mg/L de orizalina por 96 horas en medio WPM líquido y con agitación, es el mejor tratamiento para inducir duplicación cromosómica. Esto se debe a que produjo un 100% de vitroplantas clasificadas como tetraploides en la accesión A007 y un 67% en la A015 y un porcentaje de sobrevivencia de 75 y 60% respectivamente. Aun así, debe tomarse en cuenta que en las pruebas preliminares, a una concentración de 3 mg/L de orizalina por un periodo de 10 días, se fomentó la duplicación cromosómica en ambas especies de arándano silvestre. Por esta razón, en futuros ensayos se podría evaluar si dosis más bajas de orizalina por un tiempo de exposición mayor, generarían plantas tetraploides en un porcentaje considerable y con un alto porcentaje de sobrevivencia (Nadler *et al.* 2012, Takamura *et al.* 2002).

Según los resultados obtenidos, se confirma que para generar plantas tetraploides de las especies utilizadas, es mejor emplear la orizalina. Esto porque se puede utilizar a concentraciones más bajas que la colchicina y fomentar duplicación cromosómica (Bouvier *et al.* 1994, Tsuda *et al.* 2012, Tosca *et al.* 1995, Yemets y Blume 2008). Además, posee un grado toxicológico inferior a la colchicina, ya que ésta presenta un DL 50 en ratas de >5000 mg/Kg (Dow AgroSciences 2013) y la colchicina 5,8 mg/Kg (Sigma-Aldrich Corporation 2013).

Otro punto importante a considerar es la estabilidad de las vitroplantas evaluadas y clasificadas como mixoploides o tetraploides. Según Lan y Shan (2007) y Miyashita *et al.* (2009), es necesario comprobar la estabilidad, ya que se podría retornar a la ploidía original; especialmente en el caso de las plantas que presentan mixoploidía. Para esto, se requieren efectuar 3 análisis de citometría de flujo distanciados entre sí por tres meses. En el último análisis se puede confirmar la ploidía no solo por citometría de flujo sino también por conteo de cromosomas. En esta investigación, no se estaba buscando determinar la estabilidad de la ploidía generada sino determinar si las concentraciones y tiempos de exposición de los explantes a los antimitóticos utilizados, eran efectivos para inducir la poliploidización en vitroplantas de *V. poasanum* y *V. consanguineum*.

Una vez que se confirme la estabilidad en la ploidía de las plantas analizadas como autoploides, se podrán determinar, de manera estadística, las características morfológicas que diferencian a una planta diploide de una tetraploide para el caso de las especies estudiadas. Algunas de las características reportadas por Escandón *et al.* (2007),

Glowacka *et al.* (2010), Rubuluza *et al.* (2007) y Ye *et al.* (2010) son: hojas, inflorescencias, tallos y frutos más grandes, aumento en el grosor de la hoja, prolongación del periodo de floración, aumento en el número de tricomas, coloración verde más oscura, aumento en el tamaño de estomas pero menor densidad, incremento en el número de cloroplastos por célula guarda, mayor producción de metabolitos secundarios e incremento en el rendimiento, entre otros.

CONCLUSIONES

1. Se estableció accesiones de las especies *V. consanguineum* y *V. poasanum* en la Subestación de Fraijanes de Alajuela.
2. Los descriptores cualitativos evaluados para caracterizar morfológicamente las dos especies de arándano silvestre, no varían entre accesiones. Por tanto, se descartan para posteriores estudios de caracterización.
3. Los descriptores cuantitativos de caracterización morfológica podrán ser empleados como base para posteriores estudios de caracterización de estas especies.
4. El uso de ácido giberélico favorece la germinación de las semillas de las especies *V. consanguineum* y *V. poasanum*, pero parece reducir el porcentaje de germinación en esta última si se utilizan dosis altas.
5. La orizalina fue más efectiva que la colchicina para la inducción de tetraploides en ambas especies evaluadas.
6. Es posible obtener tetraploides de las dos especies evaluadas.
7. La citometría de flujo es una técnica rápida y eficiente para analizar los cambios inducidos en el nivel de ploidía de ambas especies de arándano silvestre.

RECOMENDACIONES

1. Efectuar una caracterización morfológica *ex situ* con aquellas accesiones de las cuales se logren extraer al menos 10 plantas de la población original para cada accesión.
2. Volver a realizar análisis de correlación por especie con las accesiones de las cuales se logre obtener un mínimo de 10 plantas de la población original para corroborar las correlaciones obtenidas en esta investigación.
3. Realizar tratamientos de germinación de semillas con distintas concentraciones de ácido giberélico, de preferencia con el mismo lote de semilla.
4. Efectuar ensayos con orizalina a concentraciones más bajas con ambas especies de arándano silvestre y otros tiempos de exposición.
5. Determinar la estabilidad de las plantas mixoploides y tetraploides resultantes de los tratamientos con agentes antimitóticos.

LITERATURA CITADA

- Ávila, N; Nunes, P; Severo, C. 2007. Teor de Polifenóis e Composição Química do Mirtilo do Grupo Highbush. *Alim. Nutr. Araraquara*. 18(4): 365-370.
- Baskin, C; Milberg, P; Andersson, L; Baskin, J. 2000. Germination studies of three dwarf shrubs (*Vaccinium*, Ericaceae) of Northern Hemisphere coniferous forests. *Canadian Journal of Botany*. 78(12): 1552-1560.
- Bell, H. 1957. The development of Blueberry Seed. *Can. J. Botany*. 35: 139-153.
- Bouvier, L; Fillon, F; Lespinasse, Y. 1994. Oryzalin as an Efficient Agent for Chromosome Doubling of Haploid Apple Shoots in vitro. *Plant Breeding*. (113):343-346.
- Brennan, R; Caligari, P; Clark, J; Brás de Oliveira, P; Finn, C; Hancock, J; Jarret, D; Lobos, G; Raffle, S; Simpson, D. 2014. Berry Crops. *In* Dixon, G; Aldous, D. eds. 2014. *Horticulture: Plants for People and Places*. USA, Springer Science+Business Media Dordrecht. 301-325 p.
- Castro, C; Olarte, Y; Rache, L; Pacheco, J. 2012. Development of a germination protocol for blueberry seeds (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Agronomía Colombiana*. 30(2): 196-203.

- Chalak, L; Legave, J. 1996. Oryzalin combined with adventitious regeneration for an efficient chromosome doubling of trihaploid kiwifruit. *Plant Cell Reports*. 16: 97-100.
- Cires, E; Cuesta, C. 2011. Una herramienta eficaz en el estudio de la Botánica: la citometría de flujo. *Cuadernos de Biodiversidad*. 37: 19-25.
- CITA. 2013. Reporte de análisis químico de *V. consanguineum*. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 2 p.
- Contreras, A. 2008. Uso de Especies Silvestres y Cultivadas en el Mejoramiento de la Papa. *Agro Sur*. 36(3): 115-129.
- Contreras, M. 2010. Efecto de la Aplicacion de CPPU sobre la Calidad de Fruta en Arandano Alto (*Vaccinium corymbosum* L.) Cultivar Elliott. Proyecto de grado. Chile, Universidad de la Frontera. 84 p.
- Costich, D; Ortiz, R; Meagher, T; Bruederle, L; Vorsa, N. 1993. Determination of ploidy level and nuclear DNA content in blueberry by flow cytometry. *Theor Appl Genet*. 86:1001-1006.
- Cubero, J. 1999. Introducción a la Mejora Genética Vegetal. España, Universidad de Córdoba. 365 p.
- Die, J; Rowland, L. 2013. Advent of genomics in blueberry. *Molecular Breeding*. 32(32): 493-504.

- Dolezel, J; Bartos, J. 2005. Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany*. 95(1): 99–110.
- Dolezel, J; Greilhuber, J; Suda, J. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature protocols*. 2(9): 2233-2244.
- Do Valle, L; Tadeu, R. 2001. Tissue culture in ornamental plant breeding: A review. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 1(3): 283-300.
- Dow AgroSciences Ibérica SA. 2013. Ficha de datos de seguridad: Surflan A.S. Herbicide. 13 p.
- Escandón, A; Alderete, L; Hagiwara, J. 2007. In vitro polyploidization of *Mecardonia tenella*, a native plant from South America. *Scientia Horticulturae*. 115: 56–61.
- FAO. 2009. Guía para la Descripción de Suelos. Bolivia. Organización de las Naciones Unidas por la Agricultura y Alimentación. 4 ed. 111 p.
- Finn, C; Hancock, J; Olmstead, J; Brazelton, D. 2014. Blueberry Breeding Mixes Private and Public with Traditional and Molecular to Create a Vibrant New Cocktail. *Acta Hort*. 1017: 51- 62.
- Forbes, P; Mangas, E; Pagano, N. 2009. Diseño y Evaluación de Proyectos Agroindustriales: Producción de Arándanos. Argentina, Universidad Nacional de la Pampa. 67 p.

Ford, B; Schmidt, M; Armstrong, S; Barazani, O; Engels, J; Hadas, R; Hammer, K; Kell, S; Kang, D; Khoshbakht, K; Li, Y; Long, C; Lu, B; Ma, K; Tung, V; Qiu, L; Ge, S; Wei, W; Zhang, Z; Maxted, N. 2011. Crop Wild Relatives—Undervalued, Underutilized and under Threat? *BioScience*. 61(7): 559- 565.

Fourney, C; Kalt, W; Jordan, M; Vinqvist-Tymchuk, M. 2012. Blueberry and cranberry fruit composition during development. *Journal of Berry Research*. 2:169–177.

Garces, M. 2007. *Perspectivas de la Producción de Arándanos en Chile*. Chile, ComFrut. 37 p.

García, J; García, G. 2011. Orientaciones para el cultivo del arándano: El cultivo del arándano en Asturias. España, Serida. 32 p.

Gargiulo, A. 1960. Inducción Artificial de Poliploidia Mediante Colchicina en *Vitis vinifera*. *Vitis*. (2):181-189.

Głowacka, K; Jeżowski, S; Kaczmarek, Z. 2009. Polyploidization of *Miscanthus sinensis* and *Miscanthus x giganteus* by plant colchicine treatment. *Industrial Crops and Products*. 30(3): 444-446.

González, L. 2002. Proyecto Páramo Andino – Ecopar. Propagación y productos del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). “Tesis de grado”, Universidad nacional del Perú. Perú 100 p.

- González, Y. 2003. Caracterización morfológica y molecular de genotipos de *Dioscorea alata* y *D. trifida* del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, IDIAP y CATIE. Magíster Scientiae. Costa Rica, CATIE. 93 p.
- Hajjar, R; Hodgkin, T. 2007. The use of wild relatives in crop improvement: A survey of developments over the last 20 years. *Euphytica*. 156:1–13.
- Hammel, B; Grayum, M; Herrera, C; Zamora, N. 2010. Manual de Plantas de Costa Rica: Dicotiledóneas (Clusiaceae- Gunneraceae). Volumen 5. U.S.A. Missouri Botanical Garden Press. 970 p.
- Hancock, J; Lyrene, P; Finn, C; Vorna, N; Lobos, G. 2008. Blueberries and Cranberries. *In* Hancock, J. ed. 2008. Temperate Fruit Crop Breeding: Germplasm to Genomics. USA, Springer. 4. 459 p.
- Hansen, N; Andersen, S. 1996. In vitro chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture. *Euphytica*. 88:159-164.
- Haring, R; Lyrene, P. 2009. Detection of Colchicine Induced Tetraploids of *Vaccinium arboreum* with Flow Cytometry. *Acta Hort*. 810: 133-138.
- Henny, R; Holm, J; Chen, J; Scheiber, M. 2009. In Vitro Induction of Tetraploids in *Dieffenbachia* X "Star Bright M-1" by Colchicine. *HortScience*. 44(3): 646-650.

- Hernández, A. 2013. Caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. *Bio Ciencias*. 2(3):113-118.
- Hernández, M; Lobo, M; Medina, C; Cartagena, J. 2012. Andean Blueberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) Seed Storage Behaviour Characterization Under Low Temperature Conservation. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*. 65(2): 6627- 6635.
- Hernández, M; Lobo, M; Medina, C; Cartagena, J; Delgado, O. 2009. Comportamiento de la germinación y categorización de la latencia en semillas de mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Agronomía Colombiana*. 27(1): 15-23.
- Hidalgo, R. 2003. Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. *In* Franco, T; Hidalgo, R. eds. 2003. Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Colombia, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). 89 p.
- Husband, B; Baldwin, S; Suda, J. 2013. The Incidence of Polyploidy in Natural Plant Populations: Major Patterns and Evolutionary Processes. *In* Leith, I. ed. 2013. Plant Genome Diversity: Physical Structure, Behaviour and Evolution of Plant Genomes. Inglaterra, Springer. 345 p.
- Huei, W; Yan, C; Lin, Y. 2009. Ploidy doubling by in vitro culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. (98): 229-238.

- Jordan, M; Casaretto, J. 2006. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. *In* Squeo, F; Cardemil, L. ed. 2006. Fisiología Vegetal. Chile, Ediciones Universidad de la Serena. 1-28 p.
- Judd, W. 2014. *Vaccinium macrocarpon* Aiton. USA, ITIS Report. 1 p.
- Kadota, M; Niimi, Y. 2002. In vitro induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). *Plant Cell Rep.* (21): 282-286.
- Kameswara, N; Reddy, L; Bramel, P. 2003. Potential of wild species for genetic enhancement of some semi-arid food crops. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 50: 707–721.
- Koutoulis, A; Roy, A; Price, A; Sherriff, L; Leggett, G. 2005. DNA ploidy level of colchicine-treated hops (*Humulus lupulus* L.). *Scientia Horticulturae.* 105: 263–268.
- Lagos, T; Ordóñez, H; Criollo, H; Burbano, S; Martínez, Y. 2010. Descripción de frutales nativos de la familia Ericaceae en el altiplano de Pasto, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas.* 4(1): 9- 18.
- Lan, C; Shan, G. 2007. In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus membranaceus*. *Scientia Horticulturae.* 112(3): 339-344.

- Ligarreto, G; Ballén, A; Huertas, D. 1998. Evaluación de las características cuantitativas de 25 accesiones de maíz (*Zea mays* L .) de la zona andina. *Revista Corpoica*. 2(2): 1-5.
- Lila, M; Kellogg, J; Grace, M; Yousef, G; Kraft, T; Rogers; R. 2014. Stressed for Success: How the Berry's Wild Origins Result in Multifaceted Health Protections. *Acta Hort*. 1017: 23- 44.
- Lloyd, G; McCown, B. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture. *Intl. Plant Prop. Soc. Proc.* 30: 421-427.
- Loureiro, J; Rodriguez, E; Dolezel, J; Santos, C. 2007. Two New Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry: A Test with 37 Species. *Annals of Botany*. 100: 875–888.
- Luteyn, J. 2002. Diversity, Adaptation, and Endemism in Neotropical Ericaceae: Biogeographical Patterns in the Vaccinieae. *The Botanical Review*. 68(1): 55-87.
- Luteyn, J; Wilbur, R. 2005. Flora Costarricensis: Family #172 Ericaceae. *In* Burger, W. ed. 2005. *Botany USA*, Field Museum of Natural History. 118 p.
- Machado, A; Augusto, N; Blankenship, E; Paparozzi, E. 2009. Gibberellic Acid Promotes Seed Germination in *Penstemon digitalis* cv. Husker Red. *HortScience*. 44(3):870–873.

- Madriz, P. 2005. Parientes silvestres neotropicales del arándano (blueberry) cultivado (Ericaceae: *Vaccinium* L.): base genética para su cultivo en las montañas altas del neotrópico (2000-4000 m). No publicado:40.
- Madriz, P; Restrepo, S. 2011. Caracterización bioquímica y molecular para promover el desarrollo del cultivo de arándanos neotropicales en Colombia, Venezuela y Costa Rica. No publicado:24.
- Magnitskiy, S; Ligarreto, G. 2007. Effect of potassium nitrate, gibberellic acid, and indoleacetic acid on seed germination of Andean blueberry (*Vaccinium meridionale* Swartz). Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas. 1(2): 137-141.
- Miyashita, C; Ishikawa, S; Mii, M. 2009. In vitro induction of the amphiploid in interspecific hybrid of blueberry (*Vaccinium corymbosum* × *Vaccinium ashei*) with colchicine treatment. Scientia Horticulturae. 122(3): 375-379.
- Molero, T; Matos, A. 2008. Efectos de la Inducción Artificial de la Poliploidía en Plantas de *Aloe vera* (L.). Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas. 42(1):111-133.
- Morejohn, L; Bureau, T; Molè-Bajer, J; Bajer, A; Fosket, D. 1987. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization *in vitro*. Planta. 172: 252-264.

- Muñoz, V. 2004. Determinación de métodos para producción de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) con fines de propagación y producción comercial. Proyecto de grado. Ecuador, Universidad San Francisco de Quito. 49 p.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473- 497.
- Nadler, J; Pooler, M; Olsen, R; Coleman, G. 2012. In vitro induction of polyploidy in *Cercis glabra* Pamp. *Scientia Horticulturae*. 148:126-130.
- Novoa, V. 2010. Efecto de seis tipos de sustratos y tres dosis de Ácido α - naftalenacético en la propagación vegetativa de Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). Proyecto de grado. Ecuador, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 94 p.
- Otto, S; Whitton, J. 2000. Polyploid Incidence and Evolution. *Annu. Rev. Genet.* 34:401–37.
- Pasqual, M; Salles, L; Lima, A; Rodriguez, J. 2012. Flow Cytometry Applied in Tissue Culture, Recent Advances in Plant in vitro Culture. *In Tech*. Leva, A; Rinaldi, L. 109- 122 p.
- PhytoTechnika*. 2010. New Products from PhytoTechnology Laboratories. *PhytoTechnology Laboratories*. 3(1): 1-7.
- Pita, S; Pértega, S. 2001. Relación entre variables cuantitativas. Complejo Hospitalario Juan Canalejo. España. 8 p.

- Pintos, B; Martín, L; Gómez, A. 2014. Agentes antimitóticos en la obtención de plantas doble-haploides. *Reduca (Biología). Serie Botánica.* 7 (2): 12-18.
- Prodorutti, D; Pertot, I; Giongo, L; Gessler, C. 2007. Highbush Blueberry: Cultivation, Protection, Breeding and Biotechnology. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology.* 1(1): 44-56.
- Rodrigues, F; Rodrigues, J; Rocha, R; Pasqual, M; De Oliveira, S. 2011. Colchicine and amiprofos-methyl (APM) in polyploidy induction in banana plant. *African Journal of Biotechnology.* 10(62): 13476-13481.
- Rodríguez, A; Prohens, J; Nuez, F. 2003. Wild relatives can contribute to the improvement of fruit quality in pepino (*Solanum muricatum*). *Euphytica.* 129: 311–318.
- Rowland, L; Hancock, J; Bassil, N. 2011. Blueberry. *In* Kole, C; Folta, K. eds. 2011. Genetics, Genomics and Breeding of Berries. USA, Science Publishers. p. 1. 200 p.
- Rubuluza, T; Nikolova, R; Smith, M; Hannweg, K. 2007. *In vitro* induction of tetraploids in *Colophospermum mopane* by colchicine. *South African Journal of Botany.* 73: 259–261.
- Sábado, J. 2010. Fundamentos de bioestadística y análisis de datos para enfermería. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 146 p.

- Sigma-Aldrich Corporation. 2013. Hoja de datos de seguridad: Colchicina. Comité de Bioseguridad. 2 p.
- Sikorskaite, S; Rajamäki, M; Baniulis, D; Stanys, V; Valkonen, J. 2013. Protocol: Optimised methodology for isolation of nuclei from leaves of species in the Solanaceae and Rosaceae families. *Plant Methods*. 9(31): 1- 9.
- Silvertown, J. 1999. Seed Ecology, Dormancy, and Germination: A Modern Synthesis From Baskin And Baskin. *American Journal of Botany*. 86(6): 903–905.
- Skupień, K. 2006. Chemical composition of selected cultivars of highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.). *Folia Horticulturae*. 18(2): 47-56.
- Song, G; Hancock, J. 2011. *Vaccinium*. In Kole, C. ed. 2011. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Temperate Fruits. USA, Springer. p. 10. 197-220 p.
- Spooner, D; Ghislain, M; Simon, R; Janskey, S; Gavrilenko, T. 2014. Systematics, Diversity, Genetics, and Evolution of Wild and Cultivated Potatoes. *The Botanical Review*. 101 p.
- Taiz, L; Zeiger, E. 2007. Fisiología Vegetal. Volumen 10. España, Universitat Jaume I. 1338 p.

- Takamura, T; Lim, K; Van, J. 2002. Effect of a New Compound on Themitotic Polyploidization of *Lilium longiflorum* and Oriental Hybrid Lilies. Acta Hort. 572: 37- 42.
- Taylor, R. 1990. Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review. Journal of Diagnostic Medical Sonography. 6(1): 35-39.
- Tosca, A; Pandolfi, R; Citterio, F; Fasoli, A; Sgorbati, S. 1995. Determination by flow cytometry of the chromosome doubling capacity of colchicine and oryzalin in gynogenetic haploids of Gerbera. Plant Cell Reports. (14): 455-458.
- Tsuda, H; Kojima, S; Tetsumura, T; Komatsu, H; Kunitake, H. 2012. Induction of Polyploids in *Vaccinium* using Oryzalin and Colchicine Treatments. Hort. Res. 11(2): 205-212.
- Wannakrairoj, S; Tefera, W. 2013. *In Vitro* Chromosome Doubling in Korarima [*Aframomum corrorima* (Braun) P.C.M. Jansen] using Colchicine and Oryzalin. Kasetsart J. (Nat. Sci.). 47: 684 – 694.
- Ye, Y; Tong, J; Shi, X; Yuan, W; Li, G. 2010. Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). Scientia Horticulturae. 124: 95–101.
- Yemets, A; Blume, Y. 2008. Progress in Plant Polyploidization Based on Antimicrotubular Drugs. The Open Horticulture Journal. 1: 15-20.

ANEXOS

Anexo 1

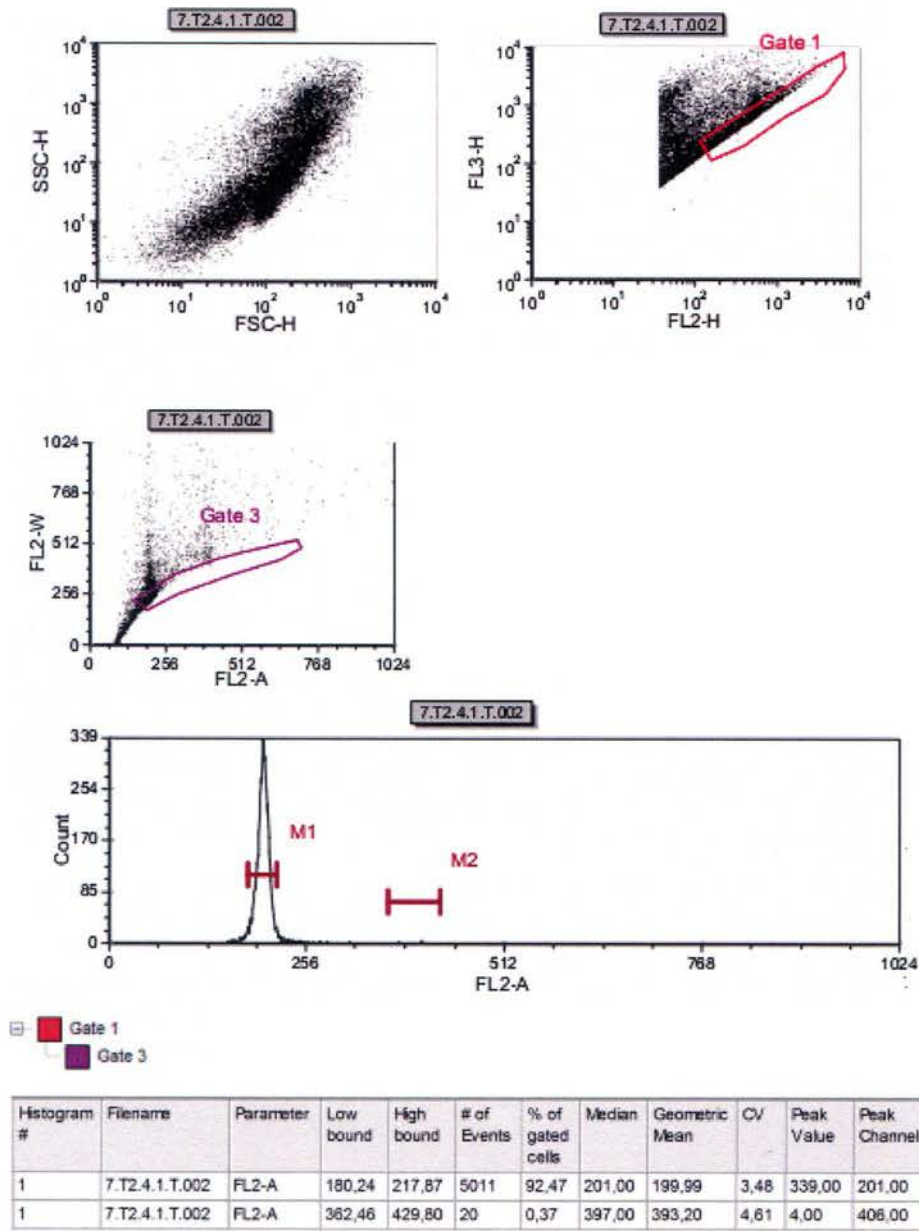
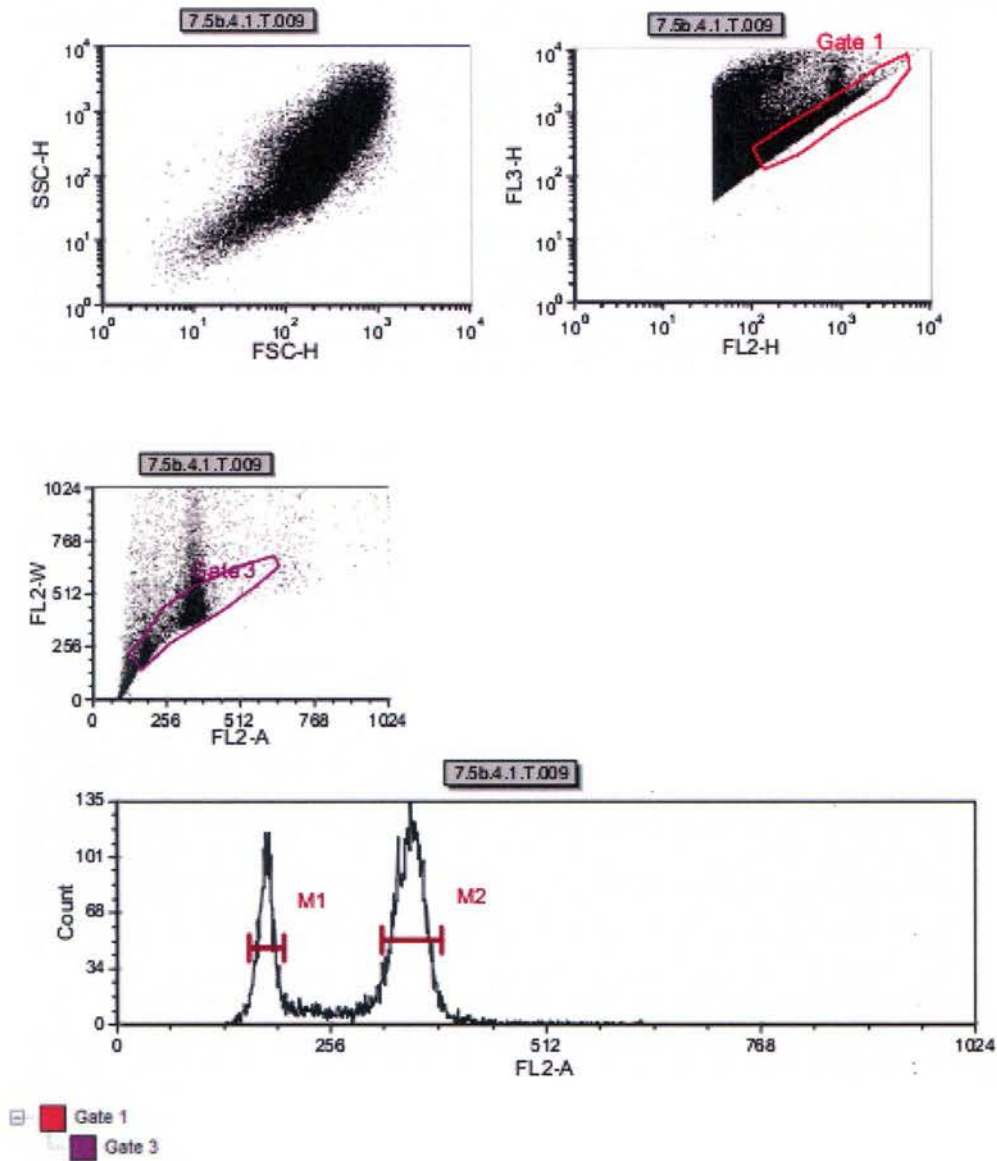


Figura 6. Análisis de citometría de flujo de una muestra diploide de arándano silvestre de Costa Rica.

Anexo 2



Histogram #	Filename	Parameter	Low bound	High bound	# of Events	% of gated cells	Median	Geometric Mean	CV	Peak Value	Peak Channel
1	7.5b.4.1.T.009	FL2-A	158,45	200,05	2267	25,55	179,00	178,63	4,99	116,00	179,00
1	7.5b.4.1.T.009	FL2-A	316,91	388,21	5109	57,58	351,00	350,41	4,52	135,00	351,00

Figura 7. Resultados de análisis de citometría de flujo de una muestra mixoploide de arándano silvestre de Costa Rica.

Anexo 3

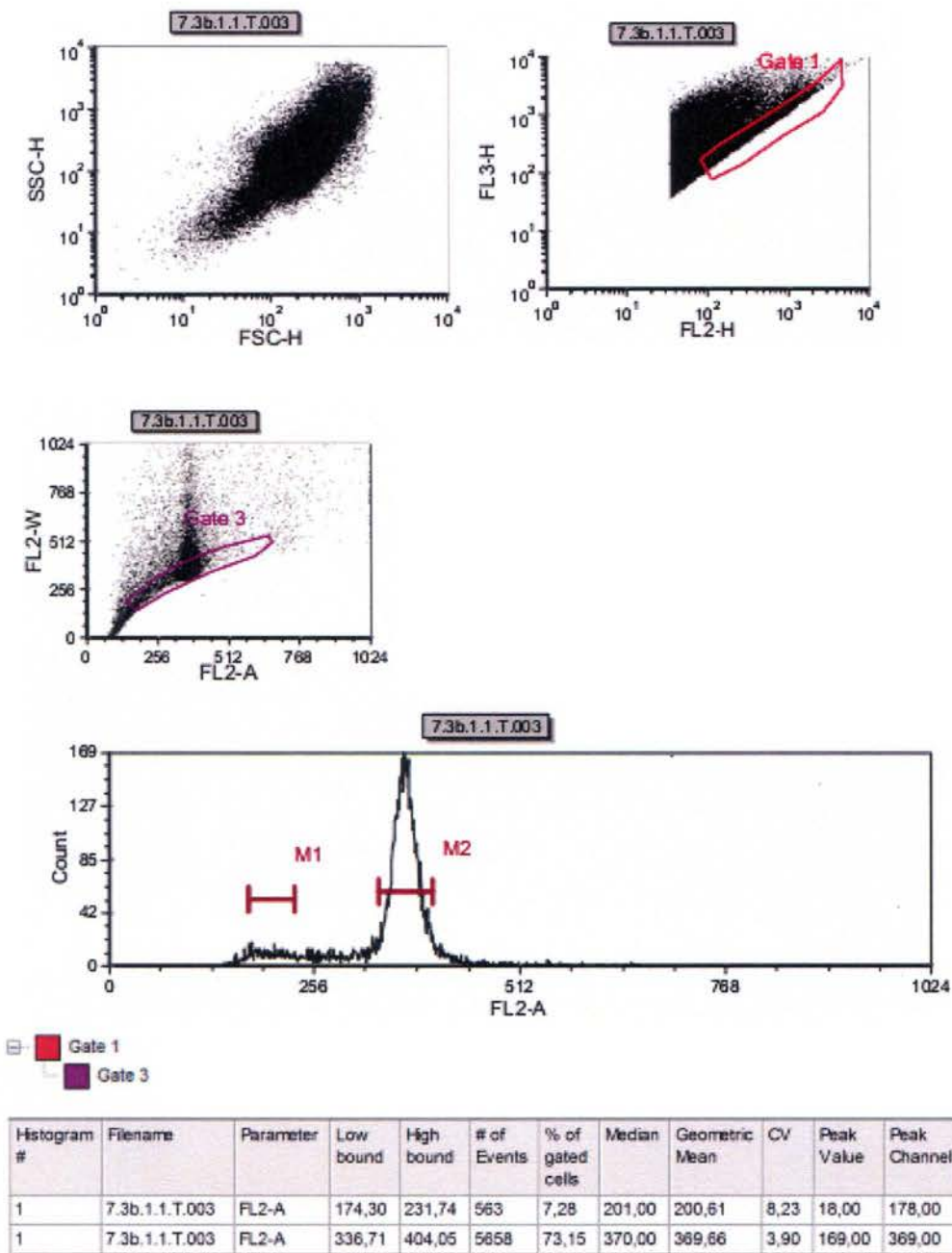


Figura 8. Resultados de análisis de citometría de flujo de una muestra tetraploide de arándano silvestre de Costa Rica.

Anexo 4

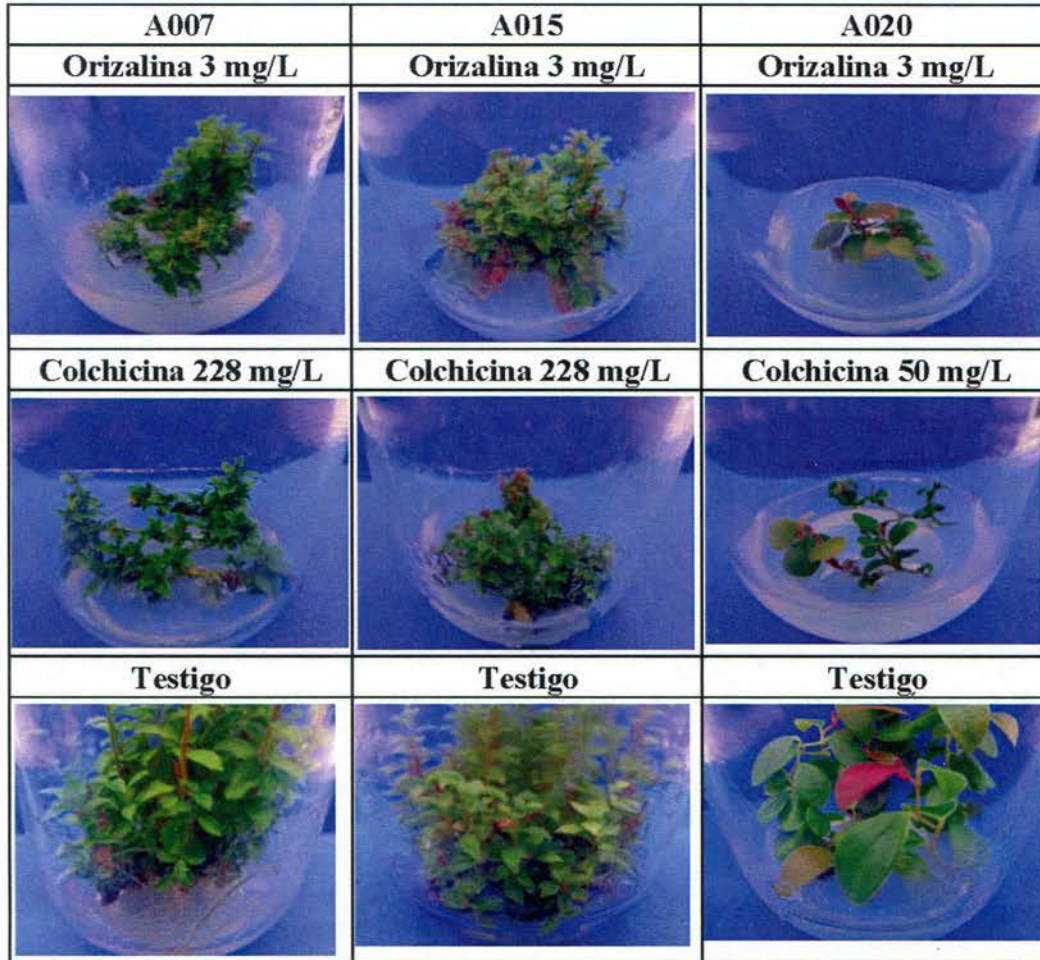


Figura 9. Apariencia de vitroplantas de accesiones de dos especies de arándano silvestre *V. consanguineum* (A007 y A015) y *V. poasanum* (A020) tratadas con dos agentes antimitóticos.

Anexo 5

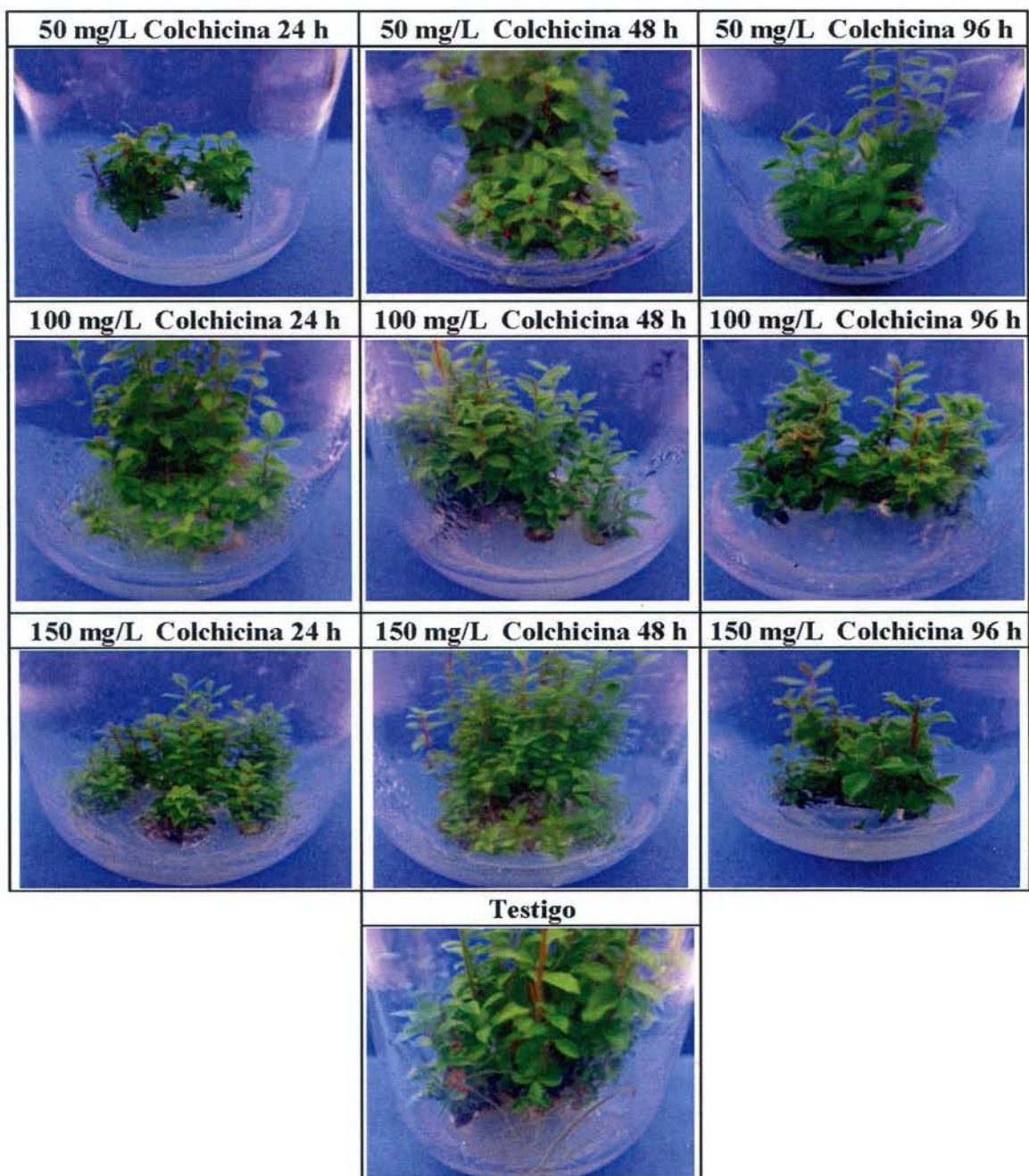


Figura 10. Apariencia de vitroplantas de la accesión A007 tratadas con distintas concentraciones de colchicina a tres tiempos de exposición.

Anexo 6

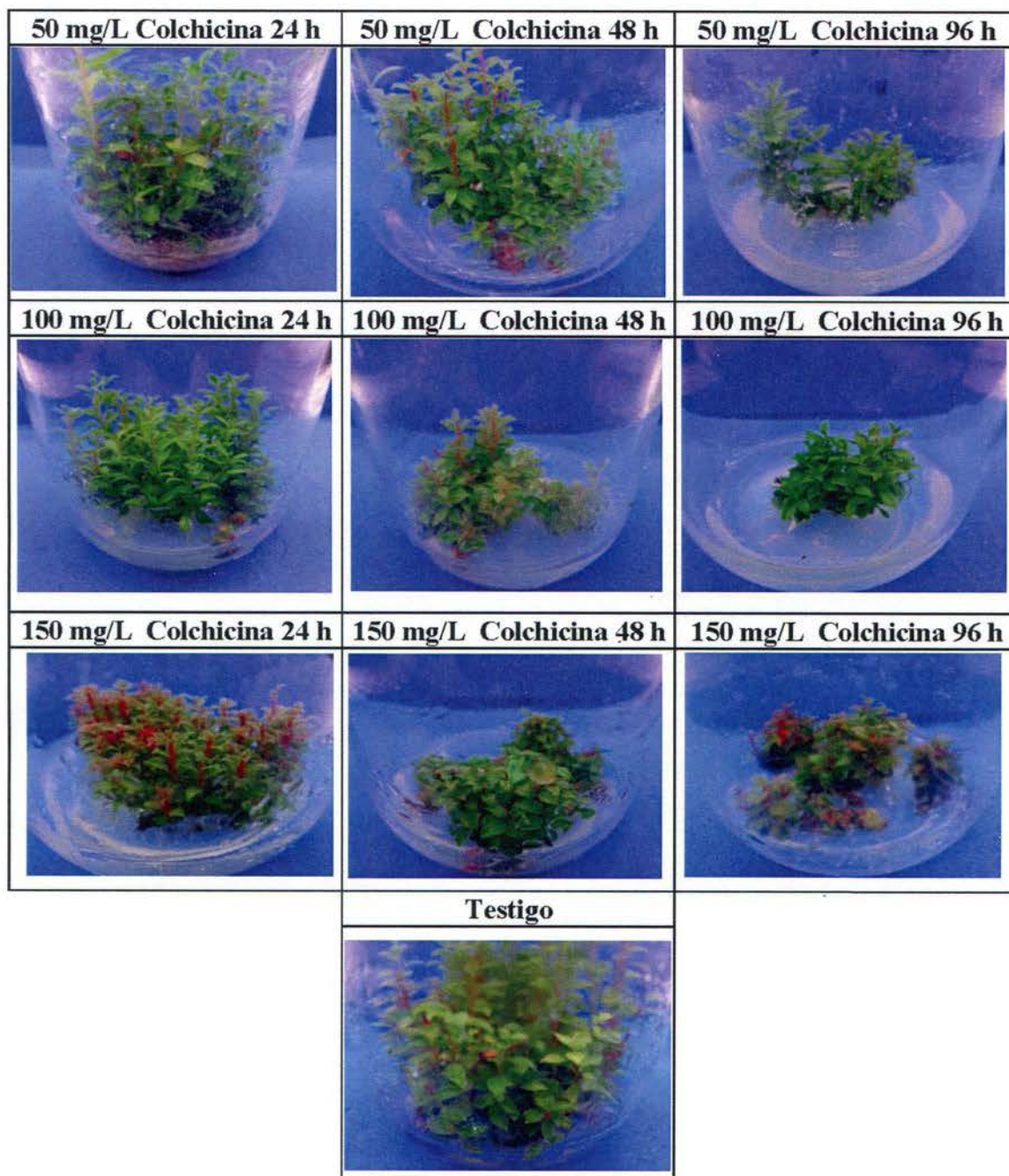


Figura 11. Apariencia de vitroplantas de la accesión A015 tratadas con distintas concentraciones de colchicina a tres tiempos de exposición.

Anexo 7

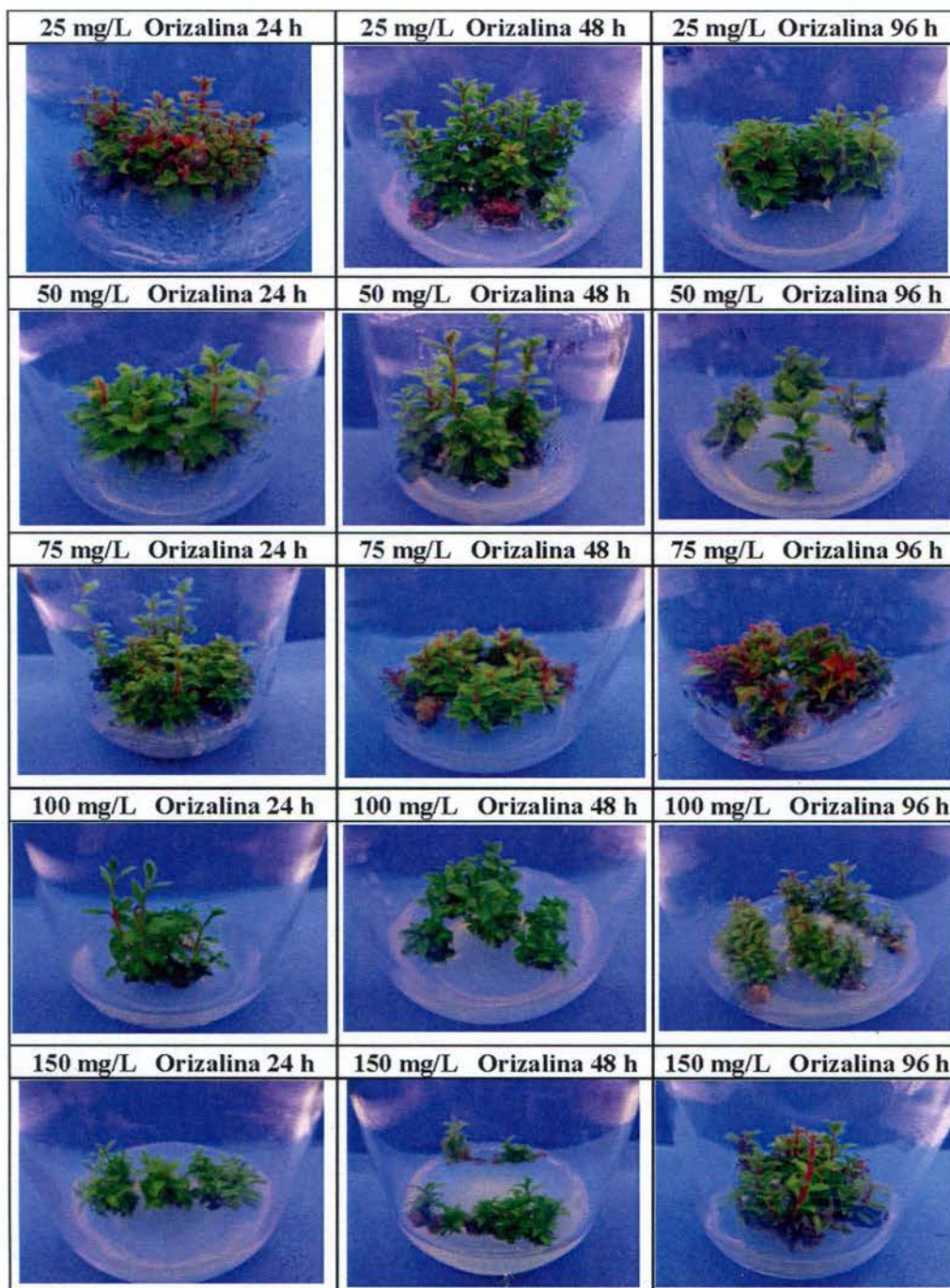


Figura 12. Apariencia de vitroplantas de la accesión A007 tratadas con distintas concentraciones de orizalina a tres tiempos de exposición.

Anexo 8

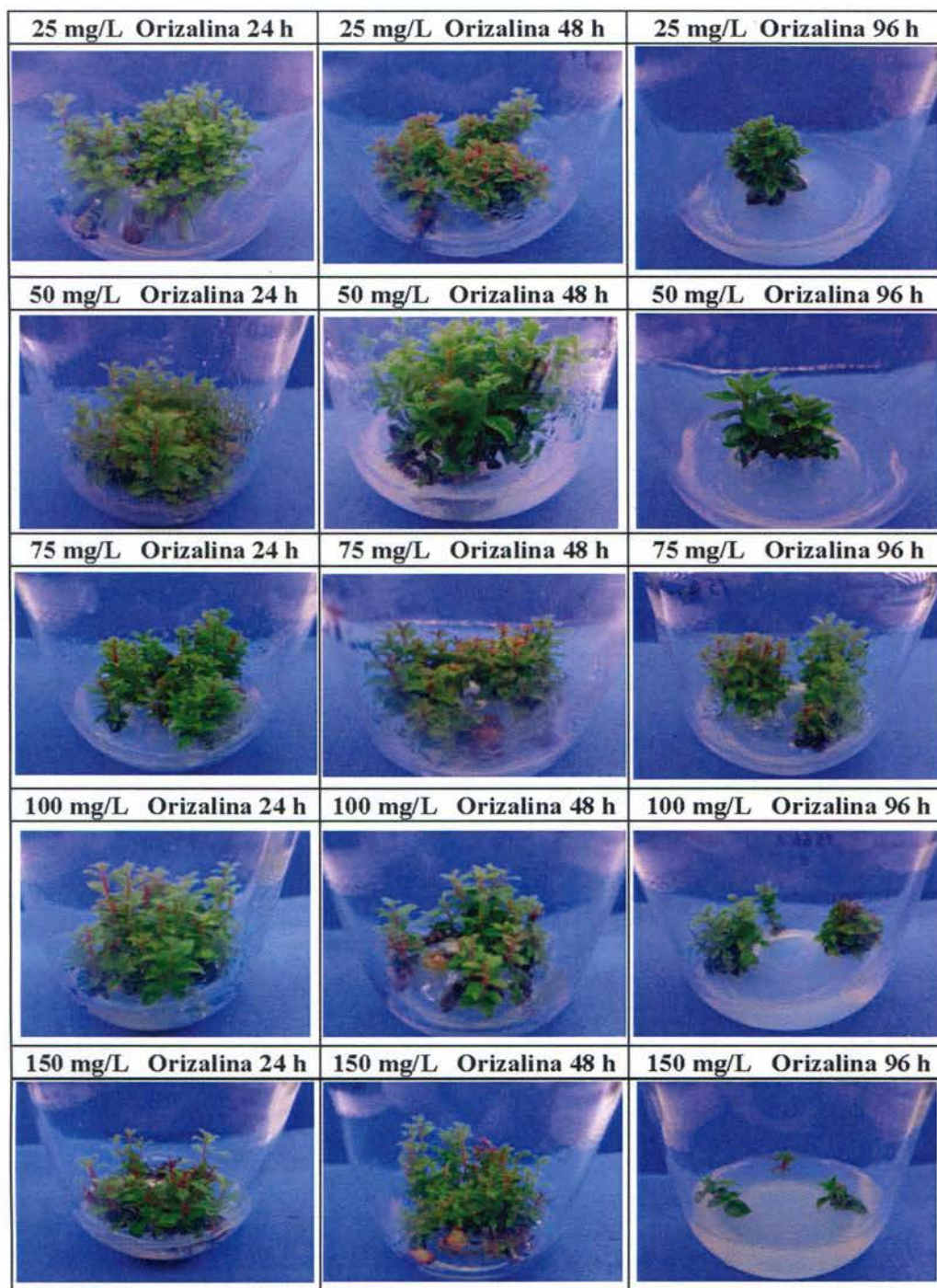


Figura 13. Apariencia de vitroplantas de la accesión A015 tratadas con distintas concentraciones de orizalina a tres tiempos de exposición.