

ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE PLANTAS SELECCIONADAS DE *Rubus glaucus* BENTH PARA EL DEPARTAMENTO DE RISARALDA (COLOMBIA)

STABLISHMENT AND *IN VITRO* PROPAGATION OF SELECTED PLANTS OF *Rubus glaucus* FOR THE DEPARTMENT OF RISARALDA (COLOMBIA)

Marta Leonor Marulanda¹, Maritza Carvajalino¹ y Héctor Vento²

Resumen

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias Ambientales de la Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia, con el objetivo de establecer la tecnología para la propagación *in vitro* de *Rubus glaucus*. El material vegetal se colectó en la colección de germoplasma de la Corporación Agrícola Colombiana (Corpoica) Regional 9, Manizales, Caldas. Los explantes seleccionados fueron desinfectados y establecidos en medio MS suplementado con 1 mg/l de GA₃ y 1 mg/l de BA. Fueron evaluados diferentes gelificantes y reguladores de crecimiento para la fase de multiplicación. La contaminación sistemática fue controlada con Claforán 50 mg/l en el medio de cultivo; el Phytigel® fue el mejor gelificante, en tanto que la combinación hormonal GA₃ 1.5 mg/l y BA 1.5 mg/l permitió obtener 11.6 brotes por explante en la fase de multiplicación.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, propagación masiva, micropropagación, mora de Castilla, *Rubus glaucus*.

Abstract

The present work was carried at the plant biotechnology laboratory in the Environmental Sciences Faculty of the Technological University of Pereira, Colombia, for developing a technology for the *in vitro* propagation of *Rubus glaucus*. The plant material was collected from germplasm collection of Corporación de Investigación Agrícola Colombiana (Corpoica) Regional 9, Manizales, Caldas. Explants were desinfected and planted on MS medium supplemented with 1 mg/l GA₃ and 1 mg/l BA. Different gelling agents and growth regulators were evaluated for the propagation stage. The systemic contamination was controlled by the adding of Claforán 50 mg/l in the medium. Phytigel® was the best gelling agent and the combination of BA 1.5 mg/l plus 1.5 mg/l GA₃ were the best conditions for the propagation stage, wich allowed to obtain 11.6 new buds per explant at the multiplication stage.

Key words: *in vitro* culture, massive propagation, micropropagation, blackberry, *Rubus glaucus*.

INTRODUCCIÓN

Rubus glaucus (Benth), que se conoce como mora de los Andes o mora de Castilla, es una especie única que combina características de los "black raspberry" (subgénero *Idaeobatus*) y de los "black-berry" (subgénero *Rubus*), y es un anfidiplóide fértil (alelotetraploide, que fusiona los dos genomas) (Jennings, 1988). *Rubus glaucus* constituye una de las nueve especies comestibles del género, nativa de los Andes colombianos, y es la única

especie del género *Rubus* cultivada comercialmente; esta especie tiene mucha demanda en el mercado nacional e internacional y existe mucho interés en su cultivo para satisfacer la demanda de la agroindustria e incrementar la oferta comercial (Ramírez del Castillo, 1989). Se cultiva por sus frutos, que se consumen crudos, en jaleas y en refrescos. Es, como la mayoría de los *Rubus*, una planta perenne que emite ramas o

Recibido: enero de 2000; aprobado para publicación: marzo de 2000.

¹ Universidad Tecnológica de Pereira. E-mail: ubioteve@andromeda.utp.edu.co.

² Universidad Agraria de La Habana, Cuba. E-mail: biotec@isch.edu.co.

cañas de un tallo corto, formando una macolla hasta de cinco metros de diámetro. Las ramas y hojas están provistas de espinas curvas, y los tallos jóvenes y el envés de las hojas están cubiertos de una cera blancuzca que le da el color característico a la especie (León, 1987).

En Colombia el cultivo de la mora de Castilla (*Rubus glaucus*) ha estado restringido a huertos caseros y su tecnificación a gran escala ha estado limitada por la dificultad en la obtención de material para siembra de buena calidad genética y sanitaria, así como en volumen suficiente para iniciar una nueva plantación (Montoya *et al.*, 1997).

La propagación sexual no es recomendable debido a la baja cantidad de semillas fértiles en cada fruto, el largo periodo de germinación y el lento desarrollo de las plántulas. Actualmente la propagación se realiza por la vía asexual, acodo y estaca. La propagación por estaca presenta dificultades porque en la etapa de enraizamiento y brote de las primeras hojas y ramas, la estaca agota sus reservas, y pierde vigor para continuar su desarrollo y eventualmente muere (Montoya *et al.*, 1997). En busca de ofrecer localmente plantas de mora en cantidad suficiente y de buena calidad genética y fitosanitaria se inició este trabajo de propagación *in vitro*. Las técnicas del cultivo *in vitro* son un instrumento de gran importancia para propagar masivamente plantas de alta calidad, en condiciones controladas, pequeño espacio e independientemente de las condiciones externas.

Aunque hay antecedentes de propagación *in vitro* de *Rubus glaucus* en Colombia, como los trabajos de Ramírez y Angarita Zerda (1990), Castro y Gaviria (1995), Ramírez *et al.* (1998) y Hernández *et al.* (1999), no se conoce un proyecto de propagación industrial de vitroplantas de mora, establecimiento en vivero y entrega a los agricultores de las plantas obtenidas, con el apoyo de instituciones encargadas del fomento y la comercialización de frutas.

Por las anteriores razones se estableció el convenio entre el Comité Departamental de Cafeteros de Risaralda, Corpoica (Corporación de Investigación Agrícola Colombiana), Regional 9, Caldas, y la Universidad Tecnológica de Pereira para la realización del presente trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección y manipulación del material vegetal

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Ambientales de la Universidad Tecnológica de Pereira (Risaralda, Colombia). Las accesiones seleccionadas pertenecen a la especie *Rubus glaucus* y son parte de la colección de germoplasma seleccionada y establecida por Corpoica (Regional Caldas). La selección de cultivares de mora, por parte de los técnicos de Corpoica, se llevó a cabo con base en parámetros de productividad, adaptación a condiciones climáticas específicas, buenas condiciones fitosanitarias, tamaño y calidad de los frutos. Se enviaron materiales de los municipios de Anserma, Manzanares, Quinchía, Guática, Riosucio, San Antonio, Pácora y Guarne. Las fuentes de material vegetal fueron ramas productivas (conocidas como hembras), y las ramas o tallos fueron colectados en el banco de germoplasma en Corpoica (Regional Manizales, Caldas). Se utilizó la metodología descrita por Castro y Gaviria (1995) y Ramírez *et al.* (1998), para establecer las estacas de campo en invernadero.

Desinfección y establecimiento *in vitro*

Los explantes fueron colectados en el invernadero temprano en la mañana y trasladados al laboratorio para la desinfección. El medio de cultivo utilizado para el establecimiento fue Murashige y Skoog (1962) a la mitad de la concentración, tiamina 0.2 mg/l, L-cisteína 100 mg/l, ácido ascórbico 100 mg/l, mio-inositol 100 mg/l, sacarosa 15 g/l, y como reguladores de crecimiento benciladenin a 1 mg/l y ácido giberélico 1 mg/l. Para controlar la contaminación sistémica con

bacterias se evaluó la adición o no del antibiótico Cefotaxime (Claforán) en el medio de cultivo a una concentración de 50 mg/l.

Fase de multiplicación

Para la fase de multiplicación se utilizaron las sales minerales de Murashige y Skoog (1962) suplementadas con tiamina 0.4 mg/l, cisteína 100 mg/l, mio-inositol 100 mg/l, ácido ascórbico 100 mg/l y sacarosa 30 g/l, variándose el tipo de gelificante y las concentraciones de reguladores de crecimiento, según las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Evaluación del gelificante en medio de multiplicación

Tratamiento	Gelificante
A	2.7 g/l Phytigel®
B	7 g/l agar
C	líquido

Tabla 2. Evaluación de concentraciones hormonales en medio de multiplicación

Tratamiento	Concentraciones hormonales
A	1.5 mg/l BA + 1.5 mg/l GA ₃
B	2.0 mg/l BA + 2.0 mg/l GA ₃

En los experimentos se emplearon 100 explantes por tratamiento con cuatro repeticiones cada uno y un diseño experimental de bloques al azar. Se tomaron datos de porcentaje de supervivencia, altura media, formación de callo, número de yemas y vitrificación. Se realizó un análisis de varianza simple de efecto fijo (ANOVA) y un análisis de rango múltiple de Duncan con el paquete estadístico Statgraphic 3.1. Los datos fueron transformados por $\sqrt{x + 1}$ para variables discontinuas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección y establecimiento *in vitro*

El empleo de Claforán a 50 mg/l añadido como antibiótico al medio de establecimiento permitió,

después de dos subcultivos sucesivos, el control de la contaminación sistémica (figura 1). En los explantes de la procedencia Quinchía se obtuvieron porcentajes de supervivencia del 45% y en las procedencias Guática y San Antonio se obtuvieron 16 y 23%, respectivamente. Los explantes establecidos *in vitro* tienen una excelente apariencia y producen un promedio de tres brotes cada uno, los cuales son transferidos a medio de multiplicación.

Fase de multiplicación

Evaluación del gelificante en medio de multiplicación. Los resultados obtenidos con la utilización de Phytigel® y agar como gelificantes, comparados a la vez con el medio líquido, se muestran en las figuras 2, 3 y 4.

En la figura 2 se observa que hay diferencias significativas entre los tres tratamientos sobre la altura media de los brotes. El mayor promedio de altura se encontró en el medio líquido seguido por Phytigel® y agar, lo cual se debe a una mayor movilidad de los nutrientes en el medio, así como a la difusión de sustancias tóxicas producidas por el metabolismo de las plantas (Orellana, 1998).

El coeficiente de multiplicación de la mora en el cultivo *in vitro* es elevado (figura 3), y el gelificante empleado tiene una influencia directa en este proceso, como se puede ver al analizar los resultados obtenidos con el Phytigel®.

Existen diferencias en el crecimiento y la multiplicación de los explantes según el tipo de gelificante que se utilice. En caña de azúcar, Phytigel® y Agargel® resultaron superiores al agar, tanto en el coeficiente de multiplicación como en la ganancia en peso (Jiménez *et al.*, 1995). Estos gelificantes tienen además la ventaja de ser más transparentes, lo que facilita la detección de contaminantes en el medio de cultivo (Orellana, 1998). En este trabajo la utilización de Phytigel® permitió obtener 11.6 brotes por explante en cada subcultivo; otros autores trabajando con *Rubus*, como Zimmerman *et al.* (1995), observaron tam-

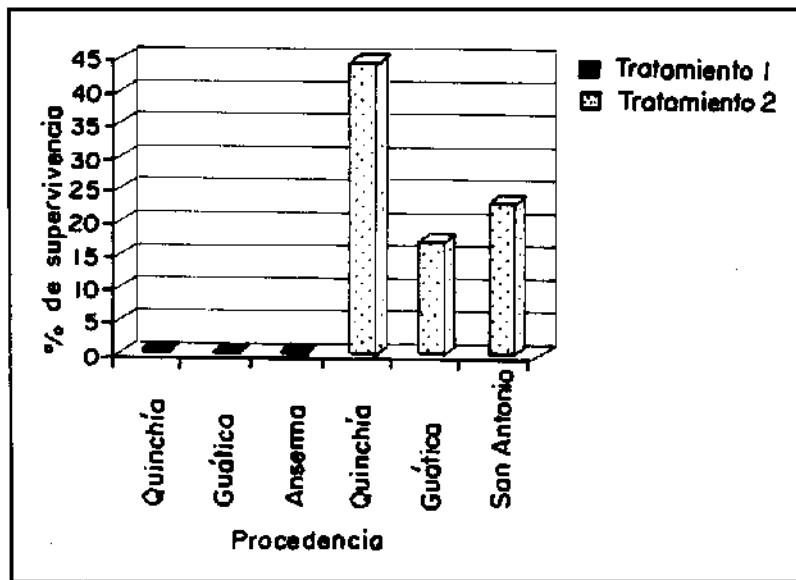


Figura 1. Efecto de la inclusión de antibiótico en el medio, sobre el establecimiento *in vitro* de explantes colectados *in vivo* (tratamiento 1 sin antibiótico y tratamiento 2 con antibiótico)

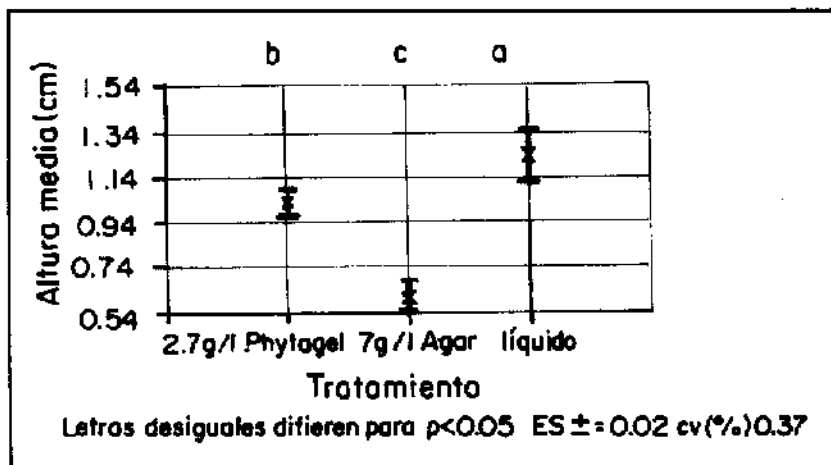


Figura 2. Efecto del gelificante sobre la altura media

bién un incremento en la proliferación de yemas en dos variedades de “raspberries” cuando utilizaron como gelificante una mezcla de almidón con Gelrite®, compuesto que resulta entre 10 y 15% más económico que el agar. Por otra parte, el hecho de que en el medio líquido y en el medio con agar se obtenga también una cantidad relativamente elevada de yemas y por consiguiente un coeficiente de multiplicación alto, muestra la alta capacidad organogénica de la mora.

En este experimento se observó presencia de vitrificación con el uso del Phytigel® (figura 4), siendo despreciable con el agar y el medio líquido; transcurridos quince días de realizado el subcultivo, la vitrificación desaparece totalmente.

La hiperhidratación conocida comúnmente como vitrificación es un fenómeno observado en muchas ocasiones por varios autores en determinadas etapas del cultivo *in vitro*, y es interpretada

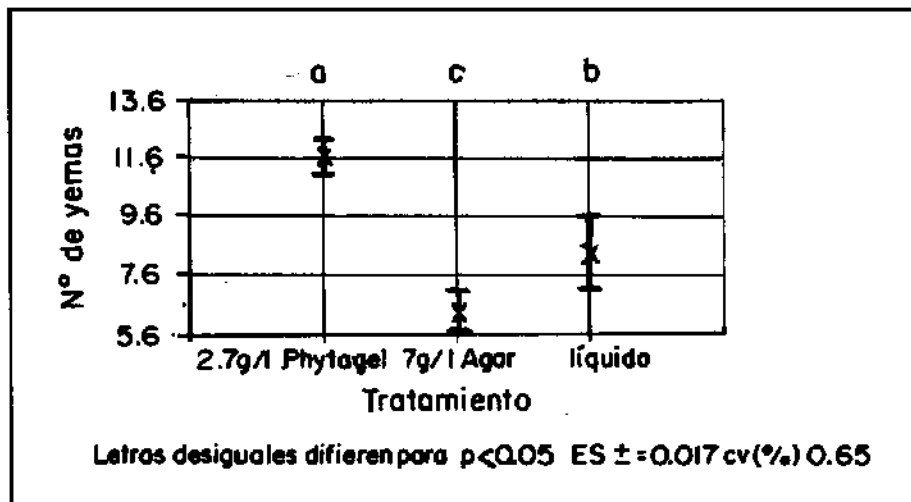


Figura 3. Efecto del gelificante sobre el número de yemas

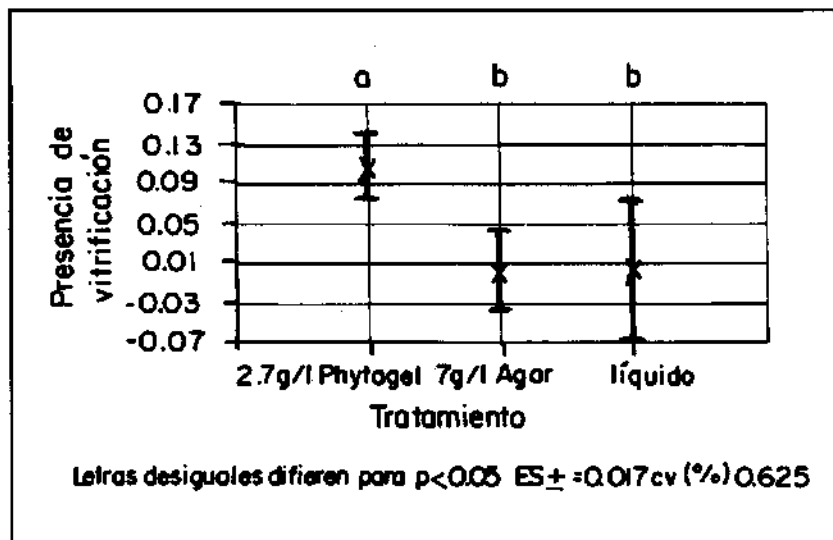


Figura 4. Efecto del gelificante sobre la vitrificación

como un aumento en el contenido de agua en las plántulas, como consecuencia de un desorden fisiológico causado por la presencia de grandes cantidades de agua residual en los espacios apoplásticos de los tejidos vegetales (Orellana, 1998). Esta manifestación influye negativamente en el proceso de endurecimiento y adaptación de las plántulas a las condiciones *ex vitro*, por lo que es necesario minimizar su presencia (Roca y Mroginski, 1993). Aunque los resultados con el medio líquido son superiores para altura media y vitrificación, su utilización no se recomienda en

la fase de multiplicación, debido al poco volumen de medio de cultivo (3 ml) por frasco, que se usa para evitar que los explantes estén totalmente sumergidos, lo que obliga a hacer subcultivos cada tres semanas estrictamente para impedir un rápido deterioro de las plantas. En la micropropagación de *Musa* se ha observado una tendencia a la disminución del coeficiente de multiplicación con subcultivos sucesivos en medio líquido, que genera problemas de oxigenación, por lo cual este medio no se recomienda durante periodos largos (Orellana, 1998). Los

resultados permiten proponer al Phytigel® como la sustancia más indicada para utilizar como gelificante, debido no sólo al efecto en la tasa de multiplicación sino en términos de costos, porque es un compuesto más económico que el agar y se requieren cantidades menores por litro de medio de cultivo.

Evaluación de la concentración hormonal en el medio de multiplicación. El aumento de la concentración de citoquinina (BA) y de ácido giberélico no influye significativamente sobre el número de yemas (figura 5). Con las concentraciones de reguladores probadas, en ambos casos el número de yemas es alto, lo que demostró una vez más, en el género *Rubus*, la importancia de

combinar BA y GA₃ para elevar la tasa de multiplicación. Esto ha sido propuesto por otros autores como Broome y Zimmerman (1978), quienes utilizaron medio MS con BA 1 mg/l y GA₃ 0.1 mg/l. Ramírez y Angarita (1990) usaron BA 2 mg/l y GA₃ 1 mg/l para estimular la elongación de los tallos de plántulas que evidenciaban un crecimiento arrocetado. Castro y Gaviria (1995), utilizando el medio de cultivo WPM BA con 1 mg/l, GA₃ 1 mg/l y Gelrite® como gelificante, obtuvieron un promedio de once yemas por explante. En contraste, la utilización de solamente BA provoca una tasa de multiplicación de sólo tres a cuatro brotes por explante, tal como lo reportan López y García (1991).

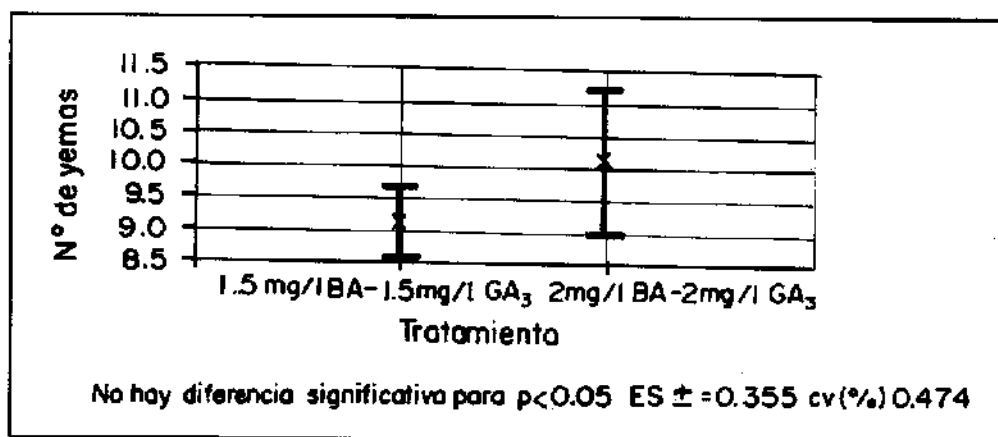


Figura 5. Efecto de la concentración hormonal en el número de yemas

Aunque el ácido giberélico tiene un reconocido efecto sobre la eliminación del crecimiento arrocetado y supresor del enanismo en esta especie (Ramírez del Castillo y Angarita Zerda, 1990), los resultados obtenidos indican que un aumento de la concentración a 2 mg/l no incrementa significativamente la altura media de las yemas (figura 6).

Con el aumento en la concentración de citoquininas es frecuente observar la formación de callos (Ramírez del Castillo y Angarita Zerda, 1990; Castro y Gaviria, 1995). Los resultados presentados en la figura 7 muestran cómo el incremento en la concentración de BA aumenta de manera significativa la producción de callos.

La formación de callo en el proceso de multiplicación no es deseable, por lo que es preferible emplear en el medio de cultivo la concentración menor de BA, si se tienen en cuenta también los resultados de Castro y Gaviria (1995), quienes empleando concentraciones de hormonas inferiores a las utilizadas en este experimento (1 mg/l de BA y 1 mg/l de GA₃), obtuvieron 20% de formación de callo.

Se evidencia que una menor concentración de reguladores de crecimiento no implica una disminución considerable en el número de brotes, ni tampoco una disminución en el tamaño de los explantes. En cambio, ayuda a evitar la formación de callo, que una vez aparece tiende a debi-

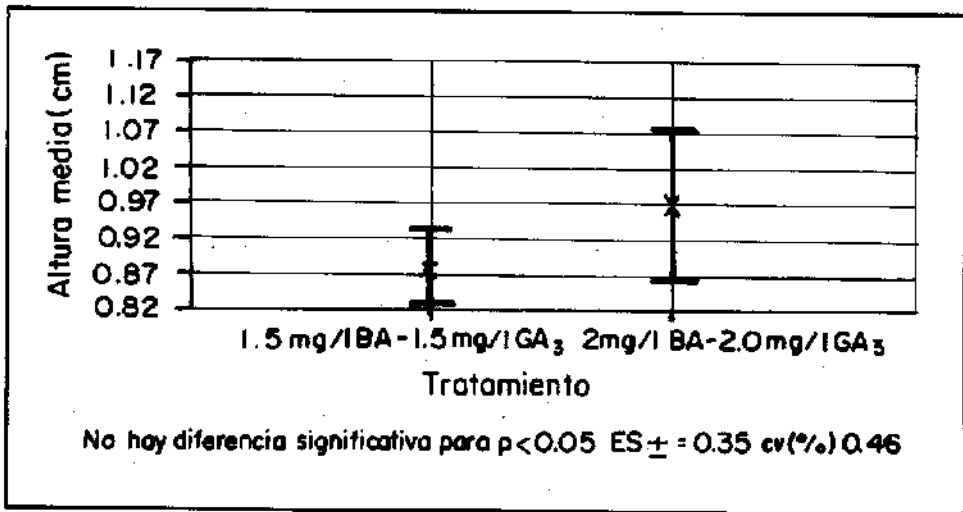


Figura 6. Efecto de la concentración hormonal sobre la altura media

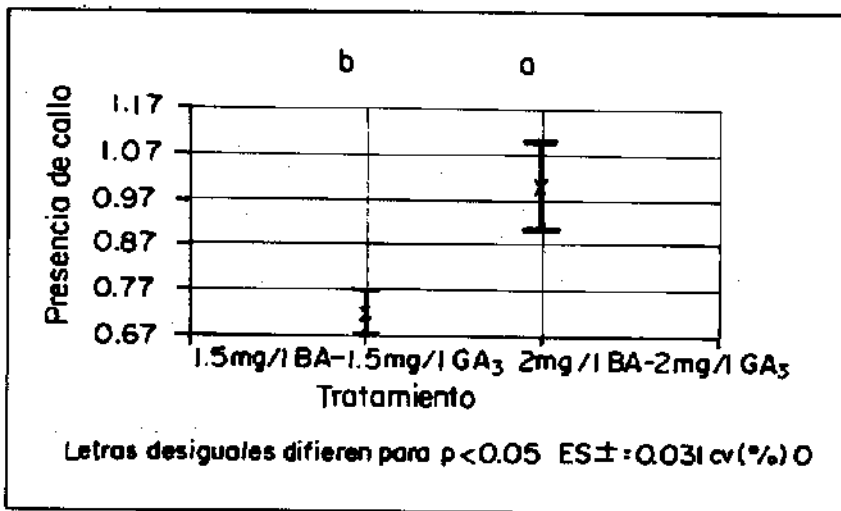


Figura 7. Efecto de la concentración hormonal en la formación de callo

litar los brotes existentes. Estos resultados corroboran los obtenidos por Ramírez y Angarita (1990) respecto de la importancia de la utilización del ácido giberélico en concentraciones de 0.1 a 1 mg/l, en combinación con BA 1 mg/l en medio de multiplicación. Otros autores, como Oligier *et al.* (1995) y Reed (1990, 1993), utilizaron para la multiplicación de *Rubus AIB* 0.1 mg/l, BA 1mg/l y GA₃ 0.1 mg/l. La eliminación del GA₃ reduce la tasa de multiplicación y favorece el crecimiento arrocetado de los explantes, como lo demostraron López y García (1991).

El comportamiento en campo de las vitroplantas fue superior al de plantas producidas por estacas en cuanto a supervivencia, tasa de crecimiento, producción de brotes basales y ramas hembras (tabla 3).

Con la metodología descrita anteriormente ha sido posible efectuar la multiplicación masiva de plantas de mora y la entrega de 40.000 plantas a los agricultores beneficiarios del convenio interinstitucional Comité Departamental de Cafeteros de Risaralda-Corpoica-Universidad Tecnológica de Pereira.

Tabla 3. Resultados parciales de la evaluación en campo de las vitroplantas de mora

Parcela	Porcentaje de supervivencia	Crecimiento promedio (m)	No. de ramas por planta	Ramas hembras por planta	Ramas machos por planta	Yemas
1						
<i>In vitro</i>	100	1.2	5	3	1	4
Estacas	100	0.5	2	2	0	2
2						
<i>In vitro</i>	100	1.1	4	2	2	4
Estacas	80	0.5	2	1	0	2
3						
<i>In vitro</i>	100	1.1	5	3	1	4
Estacas	100	0.5	2	1	1	2

CONCLUSIONES

— El mejor medio de cultivo para el establecimiento de *Rubus glaucus* fue MS a la mitad de concentración, solidificado con Phytigel® 2.7 g/l, Claforán 50 mg/l con BA 1 mg/l y GA₃ 1 mg/l y Claforán 50 mg/l.

— Para la fase de multiplicación el mejor medio fue MS con BA 1.5 mg/l y 1.5 mg/l GA₃, con Phytigel® 2.7 g/l.

— La tasa de multiplicación de mora fue de once brotes por explante, subcultivando cada cuatro semanas.

— El gelificante tiene una marcada influencia en la tasa de multiplicación, siendo mayor cuando se utilizan el Phytigel® y medio líquido.

— La vitrificación está influenciada por el gelificante; hay mayor vitrificación con la utilización del Phytigel®, pero ésta desaparece después de quince días en cultivo.

— El aumento en la concentración de BA incrementa la formación de callo, aumentando los riesgos de variantes somaclonales.

AGRADECIMIENTOS

A Colciencias por la financiación de la investigación, a Corpoica Caldas, al Comité Departamental de Cafeteros de Risaralda y a la Universidad Tecnológica de Pereira por el apoyo institucional.

REFERENCIAS

- Broome OC, Zimmerman R. 1978. *In vitro* propagation of blackberry. *Hort Sci* 13:151-153.
- Castro D, Gaviria BM. 1995. Propagación *in vitro* de especies del género *Rubus*. Investigaciones Universidad Católica de Oriente, Antioquia (Colombia), pp. 3-9.
- Hernández CA, Lopera MA, Mora BE, Cárdenas JF. 1999. Desarrollo de un protocolo de propagación masiva de la mora de Castilla (*Rubus glaucus*) mediante la utilización del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. *Actual Biol* 21(70):3-12.
- Jennings DL. 1988. *Raspberries and blackberries: their breeding, diseases and growth*. Academic Press, New York.
- Jiménez E, Feria M de, Barbón R, Capote A, Chávez M. 1995. Empleo de biorreactores para la producción de embriones

somáticos de café (*Coffea arabica* cv catimor). *Adv Modern Biotechnol* 3:11-20.

- León J. 1987. *Botánica de los cultivos tropicales*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, IICA (Colección Libros y Materiales Educativos, # 84). San José de Costa Rica.
- López BJ, García AE. 1991. *In vitro* propagation of four raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. *Rev Chapingo* 15(73-74):152-155.
- Montoya CA, Hincapié LA, Uribe V. 1997. Principales enfermedades y plagas en el cultivo de la mora. Boletín Técnico, Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Unidad de Asistencia Técnica Agropecuaria (UMATA). Quinchía, pp. 8-19.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Oliger P, Parraguez L, Gebauer M, Arce P. 1995. Micropropagation and *in vitro* regenerative studies in cultivated blackberry (*Rubus* spp.). *Ciencia e Investigación Agraria* 22(3):123-130.
- Orellana P. 1998. Propagación vía organogénesis. En: Pérez Ponce JN (ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Santa Clara, Cuba.
- Ramírez del Castillo A. 1989. Estudios preliminares para la propagación clonal *in vitro* de mora (*Rubus glaucus*). Tesis de grado, Universidad Nacional, Bogotá, pp. 1-135.
- Ramírez del Castillo A, Angarita Zerda A. 1990. Estudios preliminares para la propagación clonal *in vitro* de mora (*Rubus glaucus* L.). *Agron Colomb* 7(1-2):17-25.
- Ramírez C, Carrizosa MS, Rivera D, Linares E. 1998. Conservación del germoplasma de moras silvestres (*Rubus* spp.) de la cuenca del río el Palmar, municipio de Ubaque (Cundinamarca, Colombia). II: Conservación y manejo *ex situ*. *Plant Genetic Resources Newsletter* 115:13-22.
- Reed BM. 1990. Multiplication of *Rubus* germoplasm *in vitro*: a screen of 256 accessions. *Fruit Var J* 44:141-148.
- Reed BM. 1993. Improved survival of *in vitro* stores *Rubus* germoplasm. *J Amer Soc Horticult Sci* 118(6):890-895.
- Roca y Mroginski. 1993. *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Ciat, Cali, Colombia.
- Zimmerman RH, Bhardwaj SV, Fordham IM. 1995. Use of starch gelled medium for tissue culture of some fruit crops. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 43(3):207-213.