

DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA PROPAGACION MASIVA DE LA MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus* Bent) MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES *IN VITRO*

PROTOCOL FOR THE MASIVE PROPAGATION OF BLACKBERRY (*Rubus glaucus* Bent) USING *IN VITRO* PLANT TISSUE CULTURE

César Augusto Hernández¹, María Elena Lopera¹, Beatriz Elena Mora¹ y Juan Fernando Cárdenas¹

Resumen

Esta investigación se realizó con el propósito de desarrollar un protocolo para la propagación masiva vía *in vitro* de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Bent.), a partir de yemas axilares de esta Rosaceae con gran demanda en el mercado de nuestro país y del exterior. Los mejores resultados de los bioensayos de asepsia fueron obtenidos cuando se utilizó etanol al 50% durante tres minutos e hipoclorito de sodio al 2.5% durante dos minutos. Los procesos oxidativos fueron controlados utilizando ácido ascórbico a 100 ppm. Para la etapa de iniciación los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizaron las siguientes combinaciones hormonales: AIA (1.0 mg/l), BAP (2.0 mg/l) y AG₃ (0.5 mg/l) en medio básico Murashige y Skoog (1962). Para la producción de múltiples brotes se destacó como el mejor tratamiento aquel en el cual se combinaron concentraciones de BAP (2.0 mg/l) y AG₃ (1.0 mg/l). En la etapa de enraizamiento el mejor tratamiento fue el establecido con medio MS a la mitad de su concentración y AIA (2.0 mg/l) sin carbón activado. Las plantas obtenidas fueron adaptadas y transferidas posteriormente al campo.

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

Abstract

This research was carried out with the purpose of developing a protocol for the *in vitro* masive propagation of the blackberry (*Rubus glaucus* Bent), using axillary buds as explant from «elite» germoplasm of this Rosaceae, which has market demand not only in our country but in abroad. During aseptic procedures, the best results were obtained when ethanol at 50% for a period of three minutes or sodium hypochlorite solution at 2.5% for a period of two minutes were used. The oxidation process was controlled using ascorbic acid at 100 ppm. During the initiation step established that the interaction of IAA (1.0 mg/l), BAP (2.0 mg/l) and GA₃ (0.5 mg/l) in Murashige and Skoog (1962) basic medium was the best treatment for this stage. For the production of multiple shoots it was pointed out that the BAP (2.0 mg/l) and GA₃ (1.0 mg/l) were proved as an adequate treatment, while during the rooting stage, the good results were gotten when was used half concentrations of MS medium and IAA (2.0 mg/l) without activated charcoal. The plantlets developed were succesfully adapted in the field.

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

INTRODUCCIÓN

En Colombia la mora de Castilla también es conocida como «mora de los Andes», en Ecuador y Perú como «mora azul» y en Estados Unidos como «blackberry».

La mora de Castilla es en la actualidad, dentro de la familia de las rosáceas, una de las frutas más apetecidas tanto en el mercado nacional como en el internacional. Su cultivo presenta una importante demanda principalmente por su sabor, apariencia, calidad y utilización de sus frutos.

Aprovechando que el país se interesa actualmente por los frutales, y entre ellos la mora de Castilla, es necesario desarrollar técnicas de laboratorio y de campo actualizadas, mejoradas y modernas que permitan no sólo el máximo rendimiento del cultivo, sino también conocer su fisiología básica. De esta manera se pueden complementar técnicas que reemplacen las formas artesanales que tradicionalmente se han usado en todas las regiones del país para poder suplir las demandas en lo que hace referencia a la elaboración de jugos, yogures, postres, helados, etc.

En Colombia la mora de Castilla es un renglón importante dentro de la economía nacional, lo que se demuestra observando que en el año de 1996 se tenían sembradas 3815 ha con un rendimiento de 8.70 ton/ha, lo que equivale a una producción aproximada de 33.535 ton, sin que esto alcanzara a suplir la demanda interna de nuestro país (Corpoica, 1997). Arias (1994) estableció que el municipio de mayor producción de mora de Castilla del Oriente antioqueño era Santa Elena (corregimiento de Medellín), con una producción de 0.22 kg/planta/semana, 11.30 kg/planta/año y 29.279.40 kg/ha/año, por encima de municipios como Guarne, Rionegro, El Retiro y La Ceja.

Normal y tradicionalmente la mora de Castilla se reproduce por acodos y en algunos casos por estacas; sin embargo, estos procedimientos presentan diferentes tipos de problemas reproductivos debido a lo siguiente: 1. El número

de ramas productivas es bajo; 2. Por acodo de punta se obtiene una sola planta por rama, lo que implica una reducción en la capacidad productiva de la fruta; y 3. Las estacas tienen baja capacidad de enraizamiento.

Teniendo en cuenta estos aspectos, la técnica del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se constituye en una alternativa, algunas veces con mayores ventajas que los sistemas tradicionales anteriormente mencionados, con beneficios para el propagador de plantas, el mejorador, el fitopatólogo y el agricultor, puesto que pueden contar con plantas limpias y propagadas rápida y abundantemente, además de que les permite manejar más racionalmente los problemas sanitarios y reducir en muchos casos las aplicaciones de pesticidas (siempre y cuando se realice un manejo tecnificado del cultivo establecido) (Gaviria, 1992). Hasta el momento se han realizado, entre otros, los métodos de micropropagación que se muestran en la tabla 1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Las plantas madre se seleccionaron mediante parámetros agronómicos como sanidad, vigor y producción, a partir de plantas sembradas por sistema tradicional en una granja comercial en el municipio de Guarne, a 30 km de Medellín. Las yemas axilares, de un tamaño aproximado de 0.5 mm, fueron separadas de las ramas (estacas) después de realizado un proceso de desinfección.

Desinfección. Se tomaron porciones de estacas (microestacas) de 1 cm con una yema y se lavaron con jabón líquido comercial y abundante agua. Luego se sumergieron en etanol al 50% entre uno y cinco minutos y posteriormente en hipoclorito de sodio en concentraciones de 1, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0% entre uno y cinco minutos, más una gota de Tween 20, realizando siempre cuatro enjuagues con agua destilada estéril. Después se separaron las yemas de la microestaca y se sembraron en los medios de cultivo bajo condiciones de completa asepsia en la cámara de flujo laminar.

Tabla 1. Algunos estudios realizados *in vitro* en la familia Rosaceae.

Técnica	Cultivar	Explante sembrado	Referencia
Primeros estudios	Fresa	Yemas, meristemos	Belkengren y Miller (1962)
Haplogénesis	Fresa	Óvulos y anteras	Scott y Lawrence (1975)
Micropropagación	Fresa	Meristemos	James (1979)
	Fresa	Yemas axilares	Boxus (1973), Boxus <i>et al.</i> (1984)
	Frambuesa	Yemas axilares	Pyott y Converse (1981)
	Rosáceas en gral.	Yemas	Norton y Orton (1986)
	Mora	Yemas apicales	Zimmerman y Broome (1978), Skirvin <i>et al.</i> (1981)
	Mora	Entrenudos	Converse (1981), Marulanda <i>et al.</i> (1996)
	Mora	Yemas axilares	Ramírez del Castillo (1989)
		Yemas apicales	Gaviria (1992), Gaviria y Castro (1993), Fernández y Miller (1994)

TRATAMIENTOS

Para seleccionar las hormonas utilizadas y sus respectivas concentraciones en los diferentes tratamientos, se realizaron ensayos previos basados en los procedimientos establecidos en la literatura (Ramírez del Castillo, 1989; Gaviria, 1992; Gaviria y Castro, 1993; Fernández y Miller, 1994; Marulanda *et al.*, 1996). Se seleccionaron entonces aquellas hormonas, y sus concentraciones, que mostraron mejor desarrollo del explante en las diferentes etapas del cultivo no sólo con el fin de validar los resultados obtenidos en dichos trabajos, sino también para garantizar la posibilidad de reproducción de los mismos y bajo las mismas condiciones de experimentación tenidas en cuenta en este trabajo.

Medio de establecimiento. Las yemas axilares se colocaron individualmente en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), con 30 g/l de agar, BAP en concentraciones entre 1.0 y 5.0 mg/l, AIA entre 0.1 y 1.0 mg/l y AG₃ entre 0.1 y 1.0 mg/l, pH de 5.8, 30 mg/l de sacarosa, a 12 horas de luz y una temperatura de 25 °C ± 1 °C. Se realizaron siete tratamientos, cada uno con 20 repeticiones (tabla 2).

Medio de multiplicación. Se utilizó el mismo medio MS (1962) con BAP en concentraciones entre 0 y 10 mg/l y AG₃ entre 0 y 2.0 mg/l. Se realizaron 35 tratamientos, cada uno con 35 repeticiones (tabla 3).

Medio de enraizamiento. Los brotes se colocaron en dos tratamientos diferentes: medio de enraizamiento 1: en este ensayo se probó la acción de auxinas como AIA, ANA e IBA agregadas independientemente al medio MS (1962) en concentraciones entre 0.1 y 2.0 mg/l. Se realizaron 15 tratamientos, cada uno con 10 repeticiones. (tabla 4). Medio de enraizamiento 2: con este ensayo se pretendió medir la acción de las auxinas ANA y AIA en concentraciones entre 1.0 y 5.0 mg/l, agregadas independientemente al medio MS (1962) reducido a la mitad en todos sus componentes, con 1.0 mg/l de carbón activado (prelavado) y sin carbón activado. El carbón activado se adicionó en este experimento con el fin de ayudar a absorber sustancias que se forman como desecho, y que algunas veces pueden ser tóxicas en el medio de cultivo. Se realizaron 21 tratamientos, cada uno con 10 repeticiones (tablas 5 y 6). Todos los medios fueron sometidos al autoclave para su esterilización húmeda a 20 psi y 121 °C, durante 20 minutos.

A los cuatro meses y medio del cultivo *in vitro* se sacó el material a condiciones de invernadero y se puso en una mezcla de arena, tierra y vermiculita en proporciones 1: 1: 1, bajo saram al 70% y con riego por aspersión automatizado.

Métodos estadísticos. Para cada uno de los diferentes experimentos, se realizaron los siguientes análisis estadísticos que permitieron una

Tabla 2. Tratamientos con diferentes concentraciones de BAP, AG₃ y AIA en el establecimiento de yemas (en mg/l).

Todos los ensayos tienen como base el medio básico MS (1962). A cada tratamiento se le hicieron 20 repeticiones.

Tratamientos					
1	2	3	4	5	6
(1.0) BAP	(5.0) BAP	(2.0) BAP	(1.0) BAP	(2.0) BAP	(5.0) BAP
(0.1) AG ₃	(0.1) AG ₃	(1.0) AG ₃	(0.5) AG ₃	(0.5) AG ₃	(0.5) AG ₃
(1.0) AIA	(1.0) AIA	(0.1) AIA	(0.1) AIA	(1.0) AIA	(0.1) AIA

Tabla 3. Tratamientos con diferentes concentraciones de BAP Y AG₃ en la proliferación de brotes (número de brotes) (en mg/l)

Se realizaron 39 repeticiones por tratamiento. Los tratamientos se enumeran con un superíndice entre paréntesis de izquierda a derecha, de manera horizontal.

AG ₃	BAP						
	0	0.5	1.0	2.0	3.0	5.0	10.0
0	0/0 ⁽¹⁾	0/0.5 ⁽²⁾	0/1.0 ⁽³⁾	0/2.0 ⁽⁴⁾	0/3.0 ⁽⁵⁾	0/5.0 ⁽⁶⁾	0/10.0 ⁽⁷⁾
0.5	0.5/0 ⁽⁸⁾	0.5/0.5 ⁽⁹⁾	0.5/1.0 ⁽¹⁰⁾	0.5/2.0 ⁽¹¹⁾	0.5/3.0 ⁽¹²⁾	0.5/5.0 ⁽¹³⁾	0.5/10.0 ⁽¹⁴⁾
1.0	1.0/0 ⁽¹⁵⁾	1.0/0.5 ⁽¹⁶⁾	1.0/1.0 ⁽¹⁷⁾	1.0/2.0 ⁽¹⁸⁾	1.0/3.0 ⁽¹⁹⁾	1.0/5.0 ⁽²⁰⁾	1.0/10.0 ⁽²¹⁾
1.5	1.5/0 ⁽²²⁾	1.5/0.5 ⁽²³⁾	1.5/1.0 ⁽²⁴⁾	1.5/2.0 ⁽²⁵⁾	1.5/3.0 ⁽²⁶⁾	1.5/5.0 ⁽²⁷⁾	1.5/10.0 ⁽²⁸⁾
2.0	2.0/0 ⁽²⁹⁾	2.0/0.5 ⁽³⁰⁾	2.0/1.0 ⁽³¹⁾	2.0/2.0 ⁽³²⁾	2.0/3.0 ⁽³³⁾	2.0/5.0 ⁽³⁴⁾	2.0/10.0 ⁽³⁵⁾

Tabla 4. Tratamientos con diferentes concentraciones de AIA, ANA e IBA para la inducción de raíces (número de raíces) (en mg/l).

A cada tratamiento se le hicieron 10 repeticiones.

Tratamiento N°	AIA (mg/l)	Tratamiento N°	ANA (mg/l)	Tratamiento N°	IBA (mg/l)
1	0.1	6	0.1	11	0.1
2	0.3	7	0.3	12	0.3
3	0.5	8	0.5	13	0.5
4	1.0	9	1.0	14	1.0
5	2.0	10	2.0	15	2.0

Tabla 5. Tratamientos con diferentes concentraciones de ANA con y sin carbón activado (CA) en medio MS (1962) a la mitad en la inducción de raíces (número de raíces) (mg/l). A cada tratamiento se le hicieron 10 repeticiones.

Tratamiento N°	Concentración en mg/l	Tratamiento N°	Concentración en mg/l
1	MS/2+ 1.0 CA	7	MS/2+ 3.0 ANA+ 1.0 CA
2	MS/2+ 1.0 ANA	8	MS/2+ 4.0 ANA
3	MS/2+ 1.0 ANA+ 1.0 CA	9	MS/2+ 4.0 ANA+ 1.0 CA
4	MS/2+ 2.0 ANA	10	MS/2+ 5.0 ANA
5	MS/2+ 2.0 ANA+ 1.0 CA	11	MS/2+ 5.0 ANA+ 1.0 CA
6	MS/2+ 3.0 ANA		

comparación entre los diferentes tratamientos, con el propósito de determinar en cada ensayo el más adecuado para cada una de las etapas del proceso *in vitro*: análisis de varianza, valores máximos y mínimos, análisis de residuales, pruebas de homogeneidad de varianza (Cochran, Bartlett y Hartley), análisis de rango múltiple (Tukey, Scheffé, Bonferroni, Newman Keuls, Duncan) y pruebas de normalidad. A partir de estas pruebas se construyeron las figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 (cajas de Box y Whisker) con el propósito de visualizar más claramente el mejor tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultado de la desinfección. Las yemas de mora de Castilla de un tamaño de 0.5 mm tienen en su exterior, como protección, escamas pubescentes (primordios foliares o folíolos), por lo que es necesario eliminar, después de la desinfección, dos folíolos (y en algunos casos hasta tres), dependiendo del tamaño, con el fin de realizar un adecuado proceso aséptico, principalmente de hongos y bacterias exógenas y endógenas. Es muy importante realizar un proceso eficiente de desinfección del material desde el momento de la selección y la consecución de la planta madre en el campo. En los ensayos en que apareció contaminación, ésta se hizo notoria por la presencia de hongos y bacterias entre los días 3 y 12 después de haberse realizado la siembra. En los que no se presentó contaminación, el desarrollo de la yema comienza a hacerse visible a partir del tercer día, con la apertura de dos o tres folíolos inicialmente.

Teniendo en cuenta un 1% de contaminación (dado por la cantidad de colonias y bacterias presentes) y 0% de necrosis (número de tejidos fenolizados con color violeta), se observó que la desinfección inicial en etanol al 50% por tres minutos y posteriormente en hipoclorito de sodio al 2.5% por dos minutos, fue el tratamiento más adecuado para el control eficaz de la desinfección de las yemas.

Resultado para el control de la oxidación. En este experimento, y con base en la revisión de literatura citada, en el medio de cultivo se utilizaron, antes de ser sometido al autoclave, 100 mg/l de ácido ascórbico,

con buenos resultados. Las diferencias observadas utilizando ácido cítrico no fueron muy significativas. Según Ramírez del Castillo (1989), el subcultivo como método para controlar la oxidación no es muy recomendable en esta especie. Para obtener buenos resultados en el control de oxidación, tal como fue corroborado en este trabajo, y que ha sido reportado por Ramírez del Castillo (1989), Gaviria y Castro (1993) y Fernández y Miller (1994), se deben tener en cuenta las siguientes recomendaciones: 1. No lesionar el tejido demasiado cuando se va a sembrar; 2. Se debe trabajar con plantas jóvenes; 3. Se debe efectuar inmersión de los explantes en soluciones reductoras (ácido cítrico, ácido ascórbico).

Etapa de establecimiento. Efecto de diferentes concentraciones de BAP, AG₃ y AIA en el establecimiento de yemas. Al cabo de 30 días de sembrado el explante, se observa el desarrollo y la aparición de folíolos abiertos. Estos folíolos presentan morfología normal, es decir, color verde intenso y estructuras foliares bien definidas. Los resultados obtenidos en aquellos tratamientos en que se utilizó una concentración de BAP de 2.0 mg/l, concuerdan con los resultados de algunos autores citados como Pyott y Converse (1981), Skirvin *et al.* (1981) y Ramírez del Castillo (1989), que al interactuar con concentraciones de 0.5 mg/l de AG₃ y 1.0 mg/l de AIA (como en el presente caso), proporcionan un buen desarrollo de las yemas de mora y producen un promedio mayor en el número de folíolos a los 30 días (figura 1 y tabla 2).

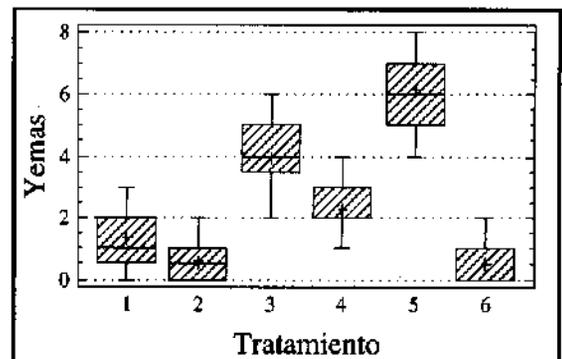


Figura 1. Promedio de yemas obtenidas mediante el efecto de diferentes concentraciones de BAP, AG₃ y AIA (ver tabla 2).

Tabla 6. Tratamientos con diferentes concentraciones de AIA con y sin carbón activado (CA) en medio MS (1962) a la mitad en la inducción de raíces (número de raíces) (mg/l). Se hicieron 10 replicaciones por tratamiento.

Tratamiento N°	Concentración en mg/l	Tratamiento N°	Concentración en mg/l
12	MS/2+1.0 AIA	17	MS/2+3.0 AIA+1.0 CA
13	MS/2+1.0 AIA+1.0 CA	18	MS/2+4.0 AIA
14	MS/2+ 2.0 AIA	19	MS/2+4.0 AIA+1.0 CA
15	MS/2+2.0 AIA+1.0 CA	20	MS/2+5.0 AIA
16	MS/2+3.0 AIA	21	MS/2+5.0 AIA+1.0 CA

En esta etapa se observó que concentraciones de BAP superiores a 2.0 mg/l favorecen la producción de callo, y que el AG₃ actúa evitando de alguna manera el fenómeno de latencia, tal y como lo manifiesta Ramírez del Castillo (1989), mientras que el AIA en la concentración encontrada parece estimular el desarrollo y alargamiento de la plántula.

Se debe anotar, tal y como lo experimentó Ramírez del Castillo (1989), que el tratamiento ideal para el desarrollo de la plántula y el número de folíolos se da con la acción de estas tres hormonas simultáneamente, pero la diferencia de estos experimentos con los de esta autora radican en que ella utilizó esta mezcla de concentraciones hormonales en una etapa posterior, mientras que en este trabajo los mejores resultados se lograron en la etapa de establecimiento.

Etapas de multiplicación. Efecto de diferentes concentraciones de BAP y AG₃ en la proliferación de brotes. En esta etapa se evaluó el número de brotes por cada plántula, los cuales presentaba buen follaje, color, tallo verdadero y se empezaba a mostrar la aparición de raíces verdaderas a los 30 días de permanecer en el medio MS (1962) suplementado con BAP y AG₃ en diferentes concentraciones.

No se utilizó la adición de auxinas en esta etapa, debido a que se consideró que al haber adicionado al medio de establecimiento AIA y encontrar una adecuada elongación y aparición deseudorraíces, se podría llevar a la plántula a una exagerada absorción de auxina causando problemas fisiológicos como el

desarrollo de callogénesis. Se debe destacar que en el medio MS (1962) suplementado con BAP (2.0 mg/l) y AG₃ (1.0 mg/l), que corresponde al tratamiento 18, se obtuvo el mayor promedio de brotes al cabo de los 30 días (figura 2 y tabla 3).

La presencia y el porcentaje de callo se observó que aumentaba conforme se incrementaba la dosis de BAP y de AG₃ por encima de las concentraciones óptimas arriba citadas, contrario a lo reportado por Gaviria y Castro (1993), quienes utilizaron 5.0 mg/l de BAP sin combinación con otras hormonas; el resultado fue la producción de callo, lo cual no es muy recomendable para la propagación clonal masiva. Los diferentes tratamientos que se utilizaron en la etapa de multiplicación se pueden observar en la tabla 3.

Se sugiere que si durante el establecimiento se adiciona al medio AIA, esta hormona no debe ser utilizada nuevamente en la etapa de multiplicación.

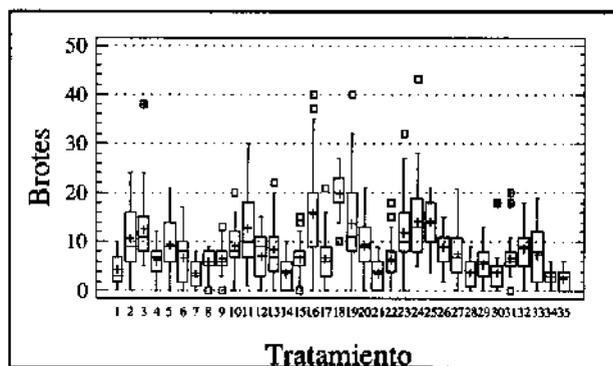


Figura 2. Promedio de brotes obtenidos mediante el efecto de diferentes concentraciones de BAP y AG₃ (ver tabla 3).

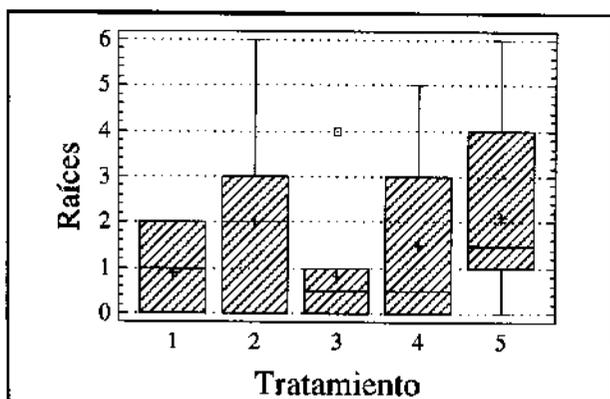


Figura 3. Promedio de raíces obtenidas mediante el efecto de diferentes concentraciones de AIA (ver tabla 4).

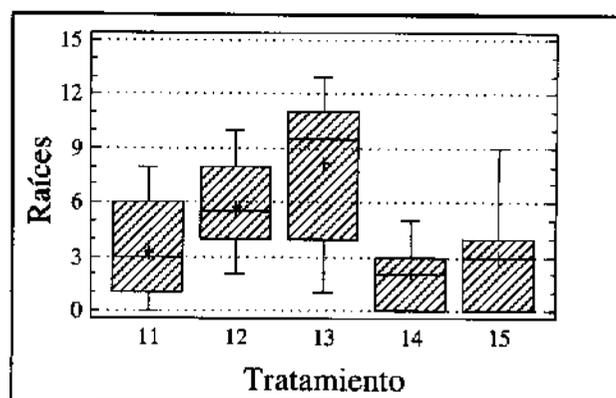


Figura 5. Promedio de raíces obtenidas mediante el efecto de diferentes concentraciones de IBA (ver tabla 4).

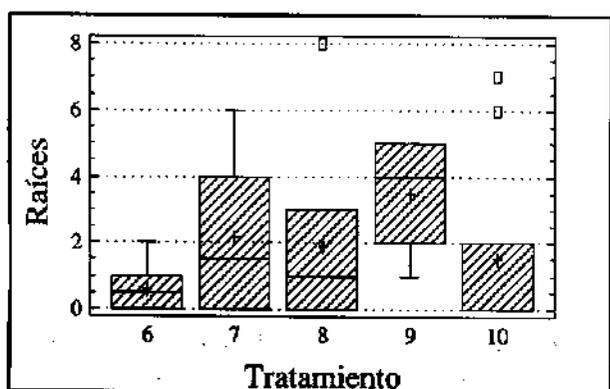


Figura 4. Promedio de raíces obtenidas mediante el efecto de diferentes concentraciones de ANA (ver tabla 4).

Etapas de enraizamiento. Efecto de diferentes concentraciones de AIA, ANA e IBA en la inducción de raíces. Se realizaron diferentes tratamientos con diferentes concentraciones de cada auxina utilizada independientemente. Para este experimento se seleccionaron las plántulas que venían de la etapa de multiplicación, las cuales presentaban hojas diferenciadas de color verde, tallo verdadero de buena apariencia y desarrollo de pequeñas raíces, como características más relevantes de este estado. Al cabo de 30 días se procedió a la observación, evaluación y conteo del número de raíces obtenidas y su apariencia, la cual mostraba raíces alargadas, blancas y bien ancladas en la base del tallo,

principalmente cuando se utilizó el AIA a una concentración de 2 mg/l (tratamiento 5, figura 3 y tabla 4), seguido en número y calidad cuando se utilizó ANA, y por último las que estuvieron en contacto con IBA (figuras 3, 4 y 5 y tabla 4). Aunque otros tratamientos utilizando ANA (1.0 mg/l, tratamiento 9 de la figura 4) e IBA (0.5 mg/l, tratamiento 13 de la figura 5), presentaron medias más altas, estas raíces eran débiles y poco desarrolladas en cuanto a su tamaño y grosor y con un color de aspecto amarillento. Esto fue comprobado posteriormente en el invernadero, en donde las plántulas que contenían 2.0 mg/l de AIA presentaron raíces de gran tamaño, buen grosor, color bastante blanco, buen anclaje y desarrollo fenotípico (tallo grueso y largo, hojas bien formadas y verdes y buen nudo radicular).

Efecto de diferentes concentraciones de ANA y AIA con y sin carbón activado en medio MS (1962) a la mitad de sus componentes, en la inducción de raíces. Los tratamientos se realizaron con diferentes concentraciones de ANA y AIA independientemente, con 1 mg/l de carbón activado y sin él, en medio MS (1962) con todos sus componentes a la mitad de sus concentraciones (figuras 6 y 7 y tablas 5 y 6). La evaluación se llevó a cabo a los 30 días, y se encontraron raíces alargadas, blancas y con un excelente nudo radicular, lo cual permite un mejor y eficiente anclaje para las etapas posteriores.

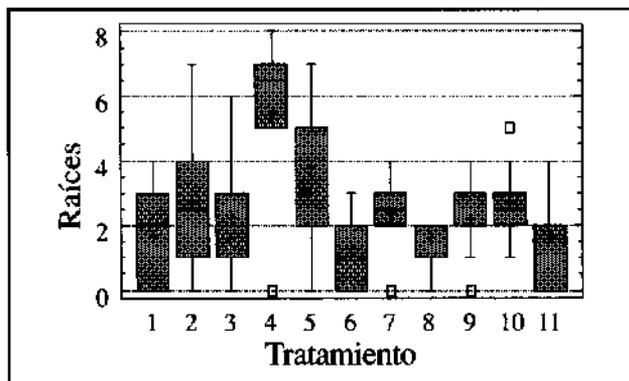


Figura 6. Promedio de raíces obtenidas mediante el efecto de diferentes concentraciones de ANA con y sin carbón activado en medio MS (1962) a la mitad de su concentración (ver tabla 5).

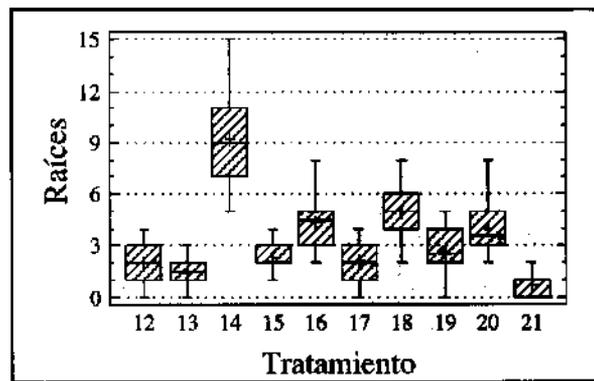


Figura 7. Promedio de raíces obtenidas mediante el efecto de diferentes concentraciones de AIA con y sin carbón activado en medio MS (1962) a la mitad de su concentración (ver tabla 6).

Se logró establecer que de todos los experimentos realizados para la obtención y producción de raíces, utilizando diferentes concentraciones de AIA, ANA en medio MS completo y a la mitad de su concentración, con y sin carbón activado, que el tratamiento 14, en el que se utilizó MS (1962) a la mitad de sus sales suplementado con 2.0 mg/l de AIA y sin carbón activado (figura 7), fue el que mostró una mejor respuesta. Cuando se planea una producción comercial de este medio en la etapa de enraizamiento, se reducen los costos, debido a que se utilizan los componentes del medio MS a la mitad de su concentración, en vez de los experimentos donde este se utiliza completo con AIA. Por lo anterior, y por las condiciones fisiológicas que presentan las raíces obtenidas con este tratamiento, se optó por utilizarlo en la etapa de enraizamiento en la propagación masiva. Las plantas enraizadas en tubo de ensayo se lavaron muy cuidadosamente para quitarles el agar de su base. Las plántulas a raíz desnuda se sembraron en vasos plásticos desechables, con una mezcla estéril de tierra, arena y vermiculita, en proporción 1: 1: 1 (Fernández, 1988).

Una vez realizada la siembra, se colocó en la parte superior del vaso boca con boca un vaso desechable transparente tipo tinto con cuatro orificios pequeños, sellando esta unión con vinilpel, con el propósito de simular una cámara húmeda y mantener una alta humedad relativa. A los ocho días se les suprimió el vinilpel a los vasos transparentes, permitiéndoles a las

plantas realizar el intercambio gaseoso con el medio exterior bajo condiciones de laboratorio, comenzando de esta manera su preadaptación (Fernández, *op. cit.*). Cinco días después, las plántulas fueron llevadas, en sus vasos, al vivero para su adaptación con el medio ambiente externo.

CONCLUSIONES

- El mejor tratamiento de desinfección consistió en sumergir las microestacas de mora de Castilla en etanol al 50% durante dos minutos, posteriormente en hipoclorito de sodio al 2.5% durante dos minutos más una gota de Tween 20 y realizar cuatro enjuagues con agua destilada estéril.
- La eliminación de las escamas que recubren la yema axilar, al igual que de un par de folíolos externos, permite realizar de una manera más efectiva el proceso después de la desinfección de las microestacas.
- El control de oxidación reportado por Ramírez (1989), Gaviria (1993) y Fernández y Miller (1994), de utilizar 100 mg/l de ácido ascórbico, se comprobó que actúa eficazmente en esta etapa.
- Para las etapas de establecimiento y multiplicación el medio más adecuado es el MS (1962) sólido. Para la etapa de enraizamiento el medio más adecuado es el MS (1962) en

concentraciones finales a la mitad y sólido. La proporción hormonal más adecuada en la etapa de establecimiento es BAP (2.0 mg/l), AIA (1.0 mg/l) y AG₃ (0.5 mg/l), la cual tuvo una duración de 30 días y presentó muy poca presencia de callo basal. El callo formado no causó ningún problema en el desarrollo de las yemas para ser transferidas a la etapa de multiplicación.

- Se observó la presencia de callo basal en concentraciones de BAP por encima de 2.0 mg/l, tal y como lo reporta Ramírez del Castillo (1989).

- El AG₃ en una concentración de 1.0 mg/l parece favorecer el rompimiento de dormancia de yemas de mora, en combinación con 2.0 mg/l de BAP (Ramírez del Castillo, 1989).

- El mejor tratamiento para la etapa de multiplicación se obtuvo con la combinación hormonal de 2.0 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de AG₃. Esta etapa tuvo una duración de 30 días y se obtuvieron plantas de tamaño normal y de una buena área foliar.

- El balance hormonal más adecuado para la etapa de enraizamiento se logró con AIA (2.0 mg/l) y medio MS (1962) a la mitad de la concentración de sus componentes y sin carbón activado. Se observaron

en promedio hasta nueve raíces de aspecto vigoroso, de buena longitud y color.

- Para la preadaptación al nivel de laboratorio de las plántulas enraizadas, se encontró que el sustrato tierra, arena y vermiculita en proporción 1: 1: 1 es el más eficiente para el desarrollo de la plántula, la cual permanece en esta etapa por un período aproximado de 30 días.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con aportes del Politécnico Colombiano "Jaime Isaza Cadavid". Los autores agradecen a Gustavo Buitrago y Marina Caro, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Santafé de Bogotá; a Gloria Azucena Fernández (asesora de la investigación) y a Francisco Palacio, de la Compañía Colombiana de Tabaco, Coltabaco; a Carlos Mario Parra, de la Universidad de Antioquia; a Róger Loaiza, Nubia Vergara, Amparo Echeverri, Mary Luz Navarro y Jesús Obed Londoño, asistentes del Laboratorio de Microcomputadores, y al personal administrativo y docente del Politécnico Colombiano.

REFERENCIAS

- Arias JH. 1994. Producción y manejo de la mora de Castilla (*Rubus glaucus*). CRECED Oriente antioqueño. Corpoica Regional 4, Rionegro, Colombia.
- Belkengreen RO, Miller PW. 1962. Culture of apical meristems of *Fragaria vesca* strawberry plants as a method of excluding latent a virus. En: Pierik RLM (eds). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid, Ed. Mundi Prensa, 325 p.
- Boxus P. 1973. The production of strawberry plants by *in vitro* micropropagation. En: Pierik RLM (*op. cit.*).
- Boxus PC, Damiano C, Brasseur E. 1984. Strawberry. Chapter 17. En: Pierik RLM (*op. cit.*).
- Broome OC, Zimmerman R. 1978. *In vitro* propagation of blackberry. *Hort Sci* 13:151-153.
- Converse RH. 1981. Relationship of prior heat treatment of growth and fruiting of "Thornless Oregon Evergreen" blackberry. *Hort Sci* 16: 312-313.
- Corpoica. 1997. Decídase por la mora de Castilla. Regional 9, Manizales. Tomado de *El Tiempo*, Santafé de Bogotá, noviembre 8.
- Fernández GA. 1988. Producción de haploides de un híbrido de tabaco negro (*Nicotiana tabacum*) por androgénesis. Universidad de Antioquia, tesis de grado. 115 p.
- Fernández CP, Miller HA. 1994. Multiplicación *in vitro* de mora (*Rubus glaucus*) a partir de yemas. Universidad del Quindío, tesis de grado, 72 p.
- Gaviria BM. 1992. Aplicación de la técnica de cultivo *in vitro* en mora y ornamentales. Monografía. Universidad Católica de Oriente. Rionegro, Antioquia. 14 p.

- Gaviria BM, Castro D.** 1993. Aplicación de la técnica de cultivo *in vitro* de mora. Seminario taller "La biotecnología vegetal: una herramienta a nuestro alcance". Universidad Católica de Oriente, Rionegro, Antioquia. 12 p.
- James DL.** 1979. The role of auxines and phloroglucinol and adventitious roots formations in *Rubus* and *Fragaria* grown *in vitro*. *Jour Hort Sci* 54: 272:277.
- Marulanda ML, Vento H, Gonzaga LG, Carvajalino M.** 1996. Propagación *in vitro* y caracterización molecular de mora de Castilla (*Rubus glaucus*). Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Ciencias Ambientales.
- Norton y Orton.** 1986. Plant cell tissue organ culture, 5 pp. 187-197. En: Pierik RLM. (*op. cit.*).
- Pyott JL, Converse RH.** 1981. *In vitro* propagation of heat treated read raspberry clones. *Hort Sci* 16: 308-309.
- Ramírez del Castillo A.** 1989. Estudios preliminares para la propagación clonal *in vitro* de mora (*Rubus glaucus*). Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá, tesis de maestría, 134 p.
- Scott DH, Lawrence FJ.** 1975. Strawberries. En: Janik J, Moore JN (eds). *Adv Fruit Breeding*. Indiana, Purdue, Univ. Press, West Lafayette, 80 p.
- Skirvin RM, Chu MC, Gómez E.** 1981. *In vitro* propagation of thornless trailing blackberries. *Hort Sci* 16: 310-312.
- Zimmerman RH, Broome OC.** 1978. Micropropagation of thornless blackberries. *Hort Sci* USDA. Monografía. pp. 23-26.