

Establecimiento in vitro y pruebas preliminares de micropropagación en medio semisólido y líquido de frambuesa (*Rubus idaeus* L.).

Fecha de recepción: 04/12/06
Fecha de aceptación: 30/03/07

Fiorella Jones Castro¹
Dora Flores Mora²

La propagación de la frambuesa se realiza tradicionalmente de forma vegetativa por separación de corona o brote etiolado; sin embargo, en vista de la demanda masiva de material sano y vigoroso, se ha generado un gran interés por el uso de la técnica de cultivo de tejidos.

Palabras clave

Rubus idaeus L., frambuesa, establecimiento in vitro, micropropagación, inmersión temporal, medio semisólido.

Key words

Rubus idaeus L., raspberry, in vitro establishment, micropropagation, temporal immersion, semisolid medium.

Resumen

La propagación de la frambuesa se realiza tradicionalmente de forma vegetativa por separación de corona o brote etiolado; sin embargo, en vista de la demanda masiva de material sano y vigoroso, se ha generado un gran interés por el uso de la técnica de cultivo de tejidos.

Para el establecimiento in vitro de la frambuesa, se realizaron tres tratamientos, la mayor supervivencia (45%) se obtuvo con una desinfección superficial de 6gL⁻¹ Agri-mycin® y Bisolex® y 5gL⁻¹ Ferbam®

durante 60 min, seguida de una exposición a CaClO₂ 3,5% por 15 min en bomba al vacío.

Se probaron dos sistemas para la micropropagación, el medio semisólido y el medio líquido en inmersión temporal, utilizando el medio de cultivo M&S complementado con BAP, AG₃ y ácido ascórbico, con un pH de 5,5. Los resultados obtenidos para ambos sistemas fueron estadísticamente similares. Los dos presentaron buena brotación y crecimiento; sin embargo las vitroplantas en inmersión temporal se observaron más vigorosas.

Abstract

Traditionally the propagation of raspberry plants has been carried out through crown division. However, the massive increase in demand of healthy and strong farming materials has generated an interest in the applications of in vitro tissue culture techniques for the mass production of varieties with high commercial significance.

1. Ingeniera en Biotecnología. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: fiorejones@gmail.com.
2. Profesora Investigadora. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: dflores@itcr.ac.cr.

For the in vitro establishment of raspberry, three different tests were applied. The highest survival rate (45%) was obtained with a surface disinfection of 6gL⁻¹ Agri-mycin® and Bisolex® plus 5gL⁻¹ Ferbam® for a period of 60 min, followed by an exposition to CaClO₂ 3.5% for 15 min inside a vacuum pump.

Two systems for micropropagation were tested: a semisolid medium and a liquid medium in temporal immersion recipients. The medium used was an M&S with the addition of BAP, GA₃ and ascorbic acid, with a pH level of 5.5. The results obtained for both systems were statistically similar and the vitroplants displayed good growth and development in both. However, those grown in the temporary immersion system appeared stronger.

Recientemente, se han identificado propiedades medicinales, lo cual ha influido en su demanda en el mercado, principalmente europeo. En la actualidad, los importadores solicitan una cantidad no inferior a 200 toneladas (Ciravegna et al., 2004).

Introducción

La frambuesa pertenece a la familia de las Rosáceas, género *Rubus*. Es un arbusto que forma parte del grupo de los *berries* o frutales menores. Es uno de los frutos de clima templado de mayor precio unitario en el mercado como producto fresco, y de interés para la agroindustria (CORFO,1982; Ciravegna et al., 2004).

Recientemente, se han identificado propiedades medicinales, lo cual ha influido en su demanda en el mercado, principalmente europeo. En la actualidad, los importadores solicitan una cantidad no inferior a 200 toneladas (Ciravegna et al., 2004).

Los mayores exportadores son España, EE. UU., Chile y Canadá, que aportan entre los cuatro el 76% de las exportaciones. Sin embargo, tanto EE. UU. como Canadá integran la lista de los mayores importadores; esto, debido a que la demanda del producto en la actualidad se encuentra altamente insatisfecha (Ciravegna et al., 2004).

La micropropagación tiene un gran potencial comercial, debido a la velocidad con la que se realiza la propagación de plantas genéticamente homogéneas, por lo general de alta calidad, que presentan vigorosidad y se encuentran libres de enfermedades (Amhed et al., 2001).

En la actualidad, se favorece el desarrollo de métodos para la micropropagación que utilizan medios líquidos, ya que permiten el escalonamiento de la micropropagación (Eide et al., 2003).

La frambuesa requiere de una cantidad considerable de arbustos productores para iniciar una plantación. Por lo tanto, realizar una investigación sobre las distintas técnicas de micropropagación (medio semisólido y medio líquido) con miras a la producción masiva, resulta interesante para facilitar a países como Costa Rica competir en el mercado internacional.

Esta investigación tuvo como objetivo desarrollar un protocolo para el establecimiento in vitro y pruebas preliminares para la micropropagación de la frambuesa en medio semisólido y líquido.

Metodología

Establecimiento in vitro

Obtención y manejo del material vegetal

El material vegetal se obtuvo en las zonas de San Francisco de Dos Ríos y Carrizal de Alajuela. Fue trasladado a condiciones de invernadero, donde se sometió a un régimen de desinfección semanal, con la aplicación de dos fungidas (Bisolex® y Ferbam®) y un bactericida (Agri-mycin®) en concentraciones de 6gL⁻¹ cada uno.

Se llevó a cabo una fertilización foliar semanal, mediante la aplicación de Byfolan® en una concentración de 5mL⁻¹.

El riego se realizó según las necesidades de las plantas.

Se seleccionaron miniestacas de 3 a 4 cm de longitud, que presentaran como mínimo un nudo con una yema central diferenciada, para utilizarlas en el establecimiento in vitro, de acuerdo con las observaciones realizadas en una investigación previa (Echeverría *et al.*, 2005).

Preparación del medio de cultivo

Se preparó un medio de cultivo M&S completo, complementado con 1,5 mgL⁻¹ de BAP, 30 gL⁻¹ de sacarosa y 3,5 gL⁻¹ de phytagel, con un pH de 5,7 (Echeverría

et al., 2005) o un pH de 5 según el tratamiento.

Se distribuyeron 20 mL de medio de cultivo en frascos de vidrio para cultivo in vitro tipo Gerber® y se autoclavaron por 25 minutos a 121 °C.

Desinfección y siembra del explante

Se realizó un lavado de las miniestacas con agua y jabón (antibacterial). Seguidamente, se aplicaron tres tratamientos de desinfección, como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Tratamientos de desinfección y pH del medio de cultivo empleados para el establecimiento in vitro de *Rubus idaeus* L

Tratamiento	Agri-mycin® (g/L)	Bisolex® (g/L)	Ferbam® (g/L)	Tiempo de exposición (min)	CaClO ₂ (%)	Bomba al vacío	Tiempo de exposición (min)	pH del medio
A	2,0	2,0	---	45	3,5	---	15	5,7
B	5,0	5,0	3,5	60	3,5	X	15	5
C	6,0	6,0	5,0	60	3,5	X	15	5

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), ITCR, 2006

Después de la desinfección, en cámara de flujo laminar, se retiraron las partes oxidadas de cada estaca, dejándolas de una longitud aproximada de 2 a 3 cm. Luego se inoculó en el medio de cultivo una estaca por frasco.

Los frascos se colocaron en un cuarto de crecimiento a una temperatura de 22 ± 2 °C, con una luminosidad de 2000 lux y un fotoperíodo de 16 horas luz.

La incubación fue de un periodo de tres semanas, durante las cuales se realizaron evaluaciones semanales de los explantes.

Micropropagación

En la etapa de micropropagación, se utilizaron dos sistemas de cultivo, el medio semisólido y el sistema de inmersión temporal (RITA®). Para el medio

semisólido se utilizaron treinta explantes (uno por frasco) por ensayo. El ensayo se repitió dos veces.

En el sistema de inmersión temporal, se utilizaron tres RITA®; en cada una se sembraron diez vitroplantas, para un total de treinta. Cada RITA® equivalió a una repetición y el ensayo se repitió dos veces.

Las variables evaluadas a los treinta días fueron: longitud de la plántula, número de ejes obtenidos por explante, número de nudos por vitroplanta, así como una valoración visual de la apariencia general del brote.

Los resultados se analizaron estadísticamente utilizando Microsoft Excel®, para determinar las diferencias entre los dos sistemas.

Medio semisólido

Preparación del medio de cultivo

Se preparó un medio de cultivo M&S completo, complementado con 2 mgL⁻¹ de BAP, 1 mgL⁻¹ de ácido giberélico (AG₃), 100 mgL⁻¹ de ácido ascórbico, 30 gL⁻¹ de sacarosa y 3,5 gL⁻¹ de phytigel, con un pH de 5,5.

Se distribuyeron 20 ml de medio de cultivo por frasco. Se autoclavó por 25 minutos a 121,1 °C.

Selección y siembra de las vitroplantas

De la etapa de establecimiento in vitro, se seleccionaron 30 vitroplantas de buena apariencia, con un tamaño entre 1 a 2 cm, generalmente con dos hojas desarrolladas por completo.

Se inoculó en el medio de cultivo una vitroplanta por frasco. Los frascos se colocaron en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 22 ± 2 °C, con una luminosidad de 2000 lux y un fotoperíodo de 16 horas luz.

Sistema de inmersión temporal

Preparación del medio de cultivo

Se preparó un medio de cultivo M&S completo, complementado con 2 mgL⁻¹ de BAP, 1 mgL⁻¹ de ácido giberélico (AG₃), 100 mgL⁻¹ de ácido ascórbico, 30 gL⁻¹ de sacarosa, con un pH de 5,5.

Se colocaron 250 mL de medio de cultivo por RITA[®], para un total de tres RITA[®]. Se autoclavaron por 25 minutos a 121,1 °C.

Selección y siembra de las vitroplantas

De la etapa de establecimiento in vitro, se seleccionaron 30 vitroplantas de buena apariencia con un tamaño entre 1 a 2 cm; generalmente con dos hojas desarrolladas por completo.

Las RITA[®] se inocularon en cámara de flujo laminar, diez vitroplantas por recipiente. Posteriormente, se colocaron en un cuarto de crecimiento, conectadas a un compresor de aire automatizado, a una temperatura de 22 ± 2 °C, con una luminosidad de 2000 lux y un fotoperíodo de 16 horas luz. La frecuencia de inmersión utilizada fue de 12 horas por un periodo de 2 minutos.

Resultados

Establecimiento in vitro

En el cuadro 2 se observan los resultados obtenidos en los tres tratamientos de desinfección realizados. El tratamiento C presentó los mejores resultados para supervivencia, oxidación y contaminación.

El análisis de varianza mostró una diferencia significativa entre los tratamientos A y B, en comparación con el tratamiento C para las tres variables.

Cuadro 2. Porcentajes de supervivencia, oxidación y contaminación para los tratamientos de desinfección en *Rubus idaeus* L.

Tratamientos	Supervivencia	Oxidación	Contaminación		
			Hongo	Bacteria	Total
A 2g/L A&B, 45 min, 3,5% CaClO ₂ 15 min sin bomba al vacío	25,00%	10,00%	18,33%	46,67%	65,00%
B 5g/L A&B y 3,5g/l F, 60 min, 3,5% CaClO ₂ 15 min bomba al vacío	33,33%	8,33%	48,33%	10,00%	58,33%
C 6g/L A&B y 5g/l F, 60 min, 3,5% CaClO ₂ 15 min bomba al vacío	45,00%	3,33%	41,67%	10,00%	51,67%

A: Agri-mycin[®]

CaClO₂: Hipoclorito de Calcio

B: Bisolex[®]

F: Ferbam[®]

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), ITCR, 2005-2006.

Micropropagación

En el cuadro 3 se muestran los resultados obtenidos en los dos sistemas de micropropagación implementados.

Los resultados obtenidos para las tres variables: longitud, número de ejes y número de nudos por vitroplanta, fueron similares para los dos sistemas.

La comparación de medias realizada demostró que no existe diferencia significativa entre ambos sistemas. Sin embargo, para el promedio de longitud de plántula el sistema de inmersión temporal presentó el mayor promedio (2,15 cm).

Cuadro 3. Promedio de longitud, número de ejes y nudos para los dos sistemas de micropropagación utilizados

Sistemas de Micropropagación		Promedio de longitud por vitroplanta (cm)	Promedio de ejes por vitroplanta	Promedio de nudos por vitroplanta
A	Medio semisólido	1,90	1,60	2,25
B	Medio líquido Inmersión temporal	2,15	1,60	2,35

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), ITCR, 2006

En la figura 1 se muestra una comparación entre una plántula proveniente de medio semisólido y otra del sistema de inmersión temporal. Es importante mencionar que en el sistema de inmersión temporal se producen vitroplantas más vigorosas y con hojas de mayor tamaño.

Discusión

Establecimiento in vitro

El tratamiento C mostró el mayor porcentaje de supervivencia, consecuencia directa de la disminución en la oxidación y la contaminación del material.



Figura 1. Plántulas de frambuesa al finalizar un mes de crecimiento. Izquierda) Medio semisólido. Derecha) RITA®

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), ITCR, 2006

El estado fisiológico de las plantas madre no fue siempre el más apropiado para la obtención de los explantes, ya que en algunas ocasiones las plantas se encontraban en etapa de floración. Esta condición puede deberse al cambio de condiciones ambientales, fotoperíodo y temperatura, que experimentó el material al ser trasladado del campo a condiciones de invernadero, que incluían fertilización y riego constante para evitar su senescencia, condición que pudo alterar el periodo de reproducción bianual reportado en la literatura (CORFO, 1982).

Para el establecimiento in vitro de una planta, se deben considerar una serie de factores que influyen en la respuesta, por ejemplo: la época del año, el estado fisiológico de la planta, el tipo de explante por utilizar y el tratamiento previo que se le aplique a las plantas antes de su introducción al laboratorio.

El estado fisiológico de las plantas madre no fue siempre el más apropiado para la obtención de los explantes, ya que en algunas ocasiones las plantas se encontraban en etapa de floración. Esta condición puede deberse al cambio de condiciones ambientales, fotoperíodo y temperatura, que experimentó el material al ser trasladado del campo a condiciones de invernadero, que incluían fertilización y riego constante para evitar su senescencia, condición que pudo alterar el periodo de reproducción bianual reportado en la literatura (CORFO, 1982).

El tejido vegetal sufre lesiones durante el proceso de desinfección; los desinfectantes superficiales tienen efectos abrasivos sobre las células (Salisbury & Ross, 1982), en tanto que el uso de bomba al vacío en el proceso de desinfección aumenta el contacto del material con los desinfectantes, incrementando el riesgo de oxidación.

Los tres tratamientos de desinfección mostraron un porcentaje de oxidación relativamente bajo, 10% y 8,33% para los tratamientos A y B y un 3,33% para el C. Esta disminución pese al aumento en las concentraciones de los desinfectantes pudo deberse a que las plantas madre de frambuesa fueron tratadas en el invernadero con algunos de los productos empleados para el establecimiento in vitro. Las concentraciones de los productos se incrementaron progresivamente, lo que podría generar una habituación de los explantes a los desinfectantes superficiales.

La contaminación por microorganismos fue el principal obstáculo al realizar el proceso de establecimiento in vitro. La diferencia que se presentó entre los tratamientos obedeció, principalmente, al incremento de las concentraciones de los desinfectantes y el tiempo de exposición de los explantes, al uso de la bomba al vacío y la disminución del pH en el medio de cultivo.

El porcentaje de contaminación bacteriana en los tratamientos B y C se mantuvo constante, lo que indica que el incremento en la concentración del bactericida no provocó ningún cambio.

En relación con los fungicidas empleados, el Ferbam® actúa como fungicida de contacto de alto espectro, posee como ingredientes activos ditiocarbamatos. Estos compuestos, derivados del azufre, inhiben la división celular, por lo que evitan el desarrollo de los hongos (González, 2000).

El Bisolex® contiene benzimidazoles, que son compuestos heterocíclicos del nitrógeno y actúan como fungicidas sistémicos de sitio específico; bloquean la mitosis y forman un enlace benzimidazol-tubulina en los organismos fungos.

Sin embargo, se ha comprobado que existen cepas de hongos resistentes a estos fungicidas (Auger, 2006), debido a la mutación de los genes específicos para la tubulina y que puede ocurrir por sobreexposición.

Esta podría ser una posibilidad para el aumento en la supervivencia de hongos en los tratamientos ya que las plantas en invernadero habían sido tratadas por meses con estos fungicidas.

Las plántulas que sobrevivieron se mostraron saludables y vigorosas; su desarrollo fue similar en los tres tratamientos (figura 2).

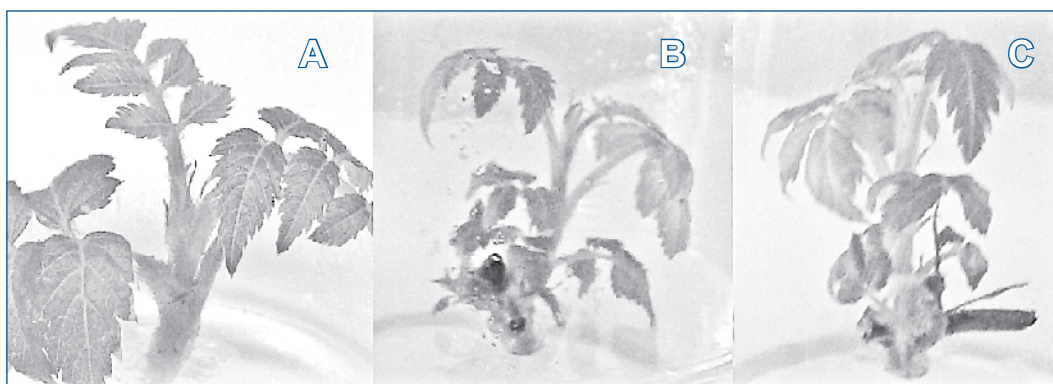


Figura 2. Explantes en diferentes etapas de crecimiento (de izquierda a derecha): A) 2 semanas, B) 3 semanas, C) 4 semanas

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), ITCR, 2005-2006

Micropropagación

A pesar de que los promedios para las tres variables fueron similares en ambos sistemas, el sistema de inmersión temporal mostró un promedio de longitud por explante (2.,15 cm) mayor al sistema de medio semisólido (1,90 cm). Además, las vitroplantas obtenidas de las RITA® fueron más vigorosas y mostraron mayor cantidad de hojas y extensión de lámina foliar.

Rubus spp se ha adaptado con éxito a la micropropagación en medio semisólido en presencia de citocininas (González *et al.*, 2000). No obstante, con el uso del medio líquido también se han obtenido buenos resultados en *Rubus glaucus* y otras especies de mora, elevando la tasa de multiplicación.

Diversas investigaciones han demostrado que en el medio líquido la disponibilidad del agua, los minerales y los reguladores de crecimiento, es mayor al compararlo con el medio semisólido, promoviendo un crecimiento más acelerado de las vitroplantas (Debergh, 1981). Los reguladores empleados BAP y AG₃ incrementan el brote y el crecimiento, por lo que es posible que su mayor disponibilidad en el medio líquido haya contribuido a la diferencia en longitud.

Las vitroplantas en medio semisólido presentaron una buena apariencia, no mostraron síntomas de oxidación, y su desarrollo fue bueno; sin embargo, los ejes obtenidos se encontraban muy agrupados, lo que dificultó la separación.

En las pruebas preliminares realizadas en medio líquido se observaron principios de hiperhidricidad y oxidación leve en algunas vitroplantas, factores que pueden haber influido en el porcentaje de brote por individuo.

Estos síntomas pueden sugerir que el periodo y frecuencia de inmersión fue mayor al requerido por la especie. Además, es importante analizar que la mayor disponibilidad de los nutrientes y reguladores en el medio líquido podría ser causa de toxicidad en las vitroplantas.

La densidad de siembra por RITA® es otro factor por considerar, ya que en esta prueba se utilizaron diez plántulas por recipiente; sin embargo se desconocen estudios previos de la aplicación del sistema de inmersión temporal en frambuesa que aporten información al respecto. El tamaño alcanzado por las hojas y los ejes sugiere que una densidad muy alta podría causar problemas de autosombreo entre las vitroplantas, lo que dificultaría su desarrollo.

Conclusiones

- Un buen manejo agronómico del material en invernadero disminuye la carga de microorganismos.
- El tratamiento de desinfección C, 6g/l Agri-mycin® & Bisolex® y 5g/l Ferbam® 60min, CaClO₂ 3,5% 15 min en bomba al vacío, fue el más apropiado para la introducción de miniestacas de frambuesa.
- El medio de cultivo un M&S completo complementado con 1,5 mg/L de 6-bencilaminopurina (BAP), 30g/L de sacarosa y 3,5g/L de phytigel, pH de 5, permite un buen desarrollo de las yemas.
- El medio de multiplicación M&S completo complementado con 2 mg/L de 6-bencilaminopurina (BAP), 1 mg/L de ácido giberélico (AG₃), 100 mg/L de ácido ascórbico, 30 g/L de sacarosa, con un pH de 5,5, evita la oxidación de los explantes y estimula la micropropagación del material.
- Ninguno de los dos sistemas probados para la micropropagación se perfila mejor que el otro, ya que el número de ejes por explante obtenidos es estadísticamente igual.
- Las plántulas cultivadas en medio líquido, mediante el sistema de inmersión temporal, podría presentar ventajas en la etapa de aclimatación al ser más vigorosas.

Recomendaciones

- Utilizar explantes con yemas bien desarrolladas.
- Las plántulas para micropropagación deben poseer un mínimo de dos hojas desarrolladas y una altura de 10 mm.
- Es importante continuar investigando los factores que influyen en la micropropagación de la frambuesa, mediante el empleo del sistema RITA®, con el fin de optimizar el protocolo.

Agradecimientos

Las autoras agradecen a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica, y al Centro de Investigación en Biotecnología, por el apoyo brindado para realizar esta investigación.

Bibliografía

- Auger, J. 2006. *La resistencia de Botrytis cinerea a los fungicidas del grupo benzimidazoles*. Disponible en: <http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/miscelaneasagronomicas30/c15.html> (1/05/06).
- Amhed, Z., Akhter, F., Haque, S., Banu, H., Rahman M., Faruquzzaman, M. 2001. *Novel Micropropagation System*. *OnLine Journal of Biological Sciences* 1 (11): 1106-1111. Disponible en: <<http://www.ansinet.org/fulltext/jbs/ljbs1111106-1111.pdf>> (14/06/05).
- Ciravegna, J., Montivero, D., Marchetta, G., Berra, I., Pizarro, M., Paz, J. 2004. *Frutas Finas*. Universidad Nacional de Cuyo. Argentina. Disponible en: <http://fing.uncu.edu.ar/catedras/industrial/industrias/archivos/industria/conferencia_frutas_finas.pdf> (13/06/05).
- CORFO (Corporación de Fomento de la Producción). 1982. *Arbustos Frutales*. Edición única. Editorial Universidad Austral de Chile. Chile. 32 pp.
- Debergh, P., Harbaoui, Y., Lemeur, R. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol. Plant.* 53: 181-187.
- Eide, C. Munster, P.H. Heyerdahl, R. Lyngved, O.A.S. Olsen. 2003. Liquid Culture Systems for Plant Propagation. *ISHS Acta Horticulturae* 625: XXVI International Horticultural Congress: Biotechnology in Horticultural Crop Improvement: Achievements, Opportunities and Limitations. Disponible en: <http://www.actahort.org/books/625/625_18.htm>
- Echeverría, F., Jones, F., Flores, D. 2005. *Introducción in vitro de frambuesa*. Informe Final. Vicerrectoría de Investigación y Extensión. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

González, R. 2000. Utilidad de los tiocarbamatos (Morfolinditiocarbamato). Vías de acción. *Rev Cubana Oncol* 2000; 16(1): 54-63. Disponible en: <http://www.bvs.sld.cu/revistas/onc/vol16_1_00/onc11100.htm> (1/05/06).

González, M., López, M., Valdes, A., Ordas, R. 2000. Micropropagation of three berry

fruit species using segments from field-grown plants. *Annals of Applied Biology*. Vol 137, N.º 1. 73 pp. Disponible en: <<http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.17447348.2000.tb00059.x>> (14/06/05).

Salisbury, F., Ross, C. 1992. Fisiología Vegetal. Editorial Iberoamérica. México, D.F. 423-435 pp.