

Propagación *in vitro* de mora (*Rubus* sp.)

Fátima Perez¹; Gino Aguirre¹; Alberto Centellas^{1,2}

¹ Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias - Universidad Mayor de San Simón

² Fundación PROINPA

E mail: l.fatimaperez@gmail.com

Resumen. La mora (*Rubus* sp.), es una especie frutícola silvestre que se encuentra amenazada o en peligro de extinción debido a factores antropogénicos, por lo que su conservación, en el presente, es muy importante. El objetivo fue ajustar los protocolos de propagación *in vitro* y generar información acerca de esta especie para el país. El material fue introducido a laboratorio en mini esquejes de 1 a 1.5 cm. En la fase de multiplicación se combinaron tres niveles de macro nutrientes ($3/4$, $1/2$, $1/4$), AG3 (0.5 y 1 mg/l) y BAP (0 - 0.5 - 1 - 1.5 - 2 mg/l). En la fase de enraizamiento se combinaron niveles de macro nutrientes (1, $3/4$, $1/2$), auxinas (AIB y AIA) con cuatro niveles de cada uno (0.25 - 0.5 - 0.75 y 1 mg/l). Se utilizó un diseño de bloques completos al azar en cada fase. En la primera fase, la tasa de multiplicación más alta fue de 8.28, con el uso de 1 mg/l de BAP, y explantes de calidad de 4.5 yemas y 1.7 cm en promedio, utilizando 0.5 mg/l de AG3 y $3/4$ de macro nutrientes, por lo que la reducción de las sales resulta positiva. En la fase de enraizamiento, AIB superó a AIA y alcanzó el 100% de enraizamiento con 9.5 raíces en promedio, aplicando 0.75 mg/l y 1 de macro nutrientes.

Palabras clave: Biotecnología; Germoplasma; Reproducción asexual; Auxinas.

Summary: The blackberry (*Rubus* sp.) propagation *in vitro*. The blackberry (*Rubus* sp.), is a wild fruit species that is threatened with extinction or endangered due to anthropogenic factors, so its conservation, is very important, at present. The objective was to adjust the *in vitro* propagation protocols and generate information about this species for the country. The material was introduced to the laboratory in mini cuttings from 1 to 1.5 cm. In the multiplication phase, three levels of macro nutrients ($3/4$, $1/2$, $1/4$), AG3 (0.5 and 1 mg/l) and BAP (0 - 0.5 - 1 - 1.5 - 2 mg/l) were combined. In the rooting phase, macro nutrient levels (1, $3/4$, $1/2$), auxins (AIB and AIA) were combined with four levels of each (0.25 - 0.5 - 0.75 and 1 mg/l). A randomized complete block design was used in each phase. In the first phase, the highest multiplication rate was 8.28, with the use of 1 mg/l of BAP, and quality explants of 4.5 yolks and 1.7 cm on average, by using 0.5 mg/l of AG3 and $3/4$ of macro nutrients, consequently, the reduction of salts is positive. In the rooting phase, AIB surpassed AIA and reached 100% of rooting with 9.5 roots on average, applying 0.75 mg/l and 1 of macro nutrients.

Keywords: Biotechnology; Germplasm; Asexual reproduction; Auxinas.

Introducción

Una de las principales características de Bolivia se manifiesta en su mega diversidad, representada no sólo por el alto número de especies flora y fauna, sino tam-

bién por la alta diversidad de unidades biogeográficas y ecosistemas que coinciden en el país (Beck 2003). Un ejemplo de esta diversidad es la especie *Rubus* sp. (mora), perteneciente a la familia Rosaceae.

Es un cultivo frutícola que se encuentra distribuido en los bosques y matorrales andinos húmedos hasta hiper húmedos de los *Yungas Peruano Bolivianos*.

En Bolivia existen 23 especies en estado silvestre (Altamirano 2009), que se constituyen en un material genético valioso, donde varias se encuentran vulnerables, amenazadas o en peligro de extinción, por la conversión de zonas vírgenes en zonas agrícolas, por lo que su conservación para un futuro, depende de la forma de protección que se le brinde en el presente, y es en esta etapa en la que la biotecnología juega un rol muy importante, pues gracias a sus beneficios, se puede realizar un manejo de material valioso en condiciones controladas y generar bancos de germoplasma con especies silvestres para su conservación.

La mora, por ser un cultivo originario de Bolivia, debería ser considerada una prioridad para la investigación, sin embargo no ha sido suficientemente estudiada, por lo que este trabajo busca generar información acerca de la propagación asexual de este frutal, con la finalidad de recuperar y valorar parte de la biodiversidad de frutales nativos del país.

Materiales y métodos

La investigación se llevó a cabo en el *Laboratorio de Biotecnología* de la *Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias* de la *Universidad Mayor de San Simón* en Cochabamba. El material vegetal fue recolectado de las provincias Carrasco y Chapare en Cochabamba. Los brotes sanos y vigorosos, con tres hojas como mínimo y de mejor aspecto, fueron llevados al laboratorio para su establecimiento *in vitro*.

Para la fase de multiplicación se preparó el medio de cultivo en base a la formulación de sales de Murashige y Skoog (1962) con la combinación de niveles de macro nutrientes ($3/4$, $1/2$, $1/4$), AG₃ (0.5 y 1 mg/l) y BAP (0 – 0.5 - 1 -1.5 - 2 mg/l), con un diseño de bloques completos al azar, con 30 tratamientos y 4 repeticiones. La unidad experimental constó de un frasco con 5 explantes cada uno. Las variables de respuesta fueron: número de brotes, tasa de multiplicación (número de explantes por explante inicial), número de yemas y tamaño de brotes.

Para la fase de enraizamiento se preparó el medio de cultivo MS, con la combinación de niveles de macro nutrientes (1, $3/4$, $1/2$), dos auxinas (AIB y AIA) y cuatro concentraciones de las mismas (0.25 - 0.5 – 0.75 - 1 mg/l), con un diseño de bloques completos al azar, con 24 tratamientos y 4 repeticiones. Las variables de respuesta fueron: enraizamiento (en %), número y longitud de raíces.

Resultados y discusión

FASE DE MULTIPLICACIÓN

Número de brotes. Para el número de brotes, en el análisis de regresión (Figura 1), se observa que el nivel óptimo que maximiza esta variable es 1.2 mg/l de BAP, alcanzando en promedio 6.7 brotes por explante.

Villa, *et al.* (2005) obtuvieron 3.99 brotes aplicando 1 mg/l de BAP; Loayza (2008) observó que al exceder 1 mg/l de este fito regulador, se inhibe la dominancia apical, provocando mayor número de brotes laterales.

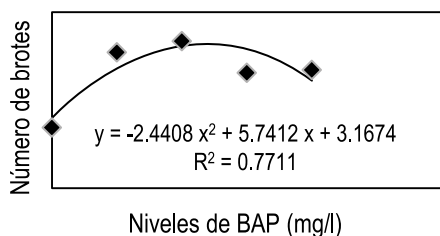


Figura 1. Regresión polinomial para número de brotes * niveles de BAP

Tasa de multiplicación. La curva de regresión polinomial para la tasa de multiplicación, muestra una tendencia cuadrática, teniendo un punto máximo con la aplicación de 1 mg/l de BAP, a partir del cual la curva desciende al incrementarse el nivel de BAP (Figura 2)

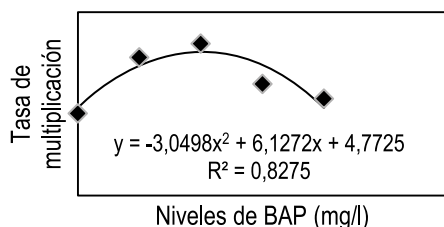


Figura 2. Regresión polinomial para la tasa de multiplicación en función a niveles de BAP

La diferencia encontrada en los resultados para esta variable, en comparación con el número de brotes es mínima, ya que aplicando 1.2 mg/l BAP, se obtiene 6.7 brotes, pero los explantes son demasiado pequeños por la inhibición de la dominancia apical; al utilizar 1 mg/l de BAP, la tasa de multiplicación es de 8.28 explantes; si se considera la aplicación de 1 mg/l de BAP, además de obtener mayor número de plantas en el repique, se obtiene plantas de mejor calidad y se reducen los costos de producción. Forni y Pasqual (1996), observaron aumento en la tasa de multiplicación con 1mg/l de BAP; Villa *et al.* (2005), obtuvieron una

rápida proliferación de brotes aplicando este mismo nivel.

Loayza (2008), observó que al exceder 1 mg/l de BAP, se inhibe la dominancia apical, provocando mayor número de brotes y disminución de tamaño de los mismos.

Tamaño de brote. El efecto de la interacción de los niveles de macro nutrientes, con los dos niveles de AG₃ para tamaño de brotes, no es estadísticamente significativo, por lo que la aplicación de 1 mg/l o 0.5 mg/l de AG₃, da resultados similares, en este caso 1.7 a 2 cm, pero el uso del nivel más bajo (0.5 mg/l), es el mejor en términos económicos, a pesar de esto, se ha demostrado que el AG₃ es indispensable para evitar el desarrollo de enanismo de brotes.

Las diferencias de esta interacción se notaron más en el comportamiento fisiológico, pues los explantes a los que se les aplicó ¼ y ½ de MS, indistintamente del nivel de AG₃, presentaron deficiencias, tales como amarillamiento de hojas, palidez y debilidad en los tallos; por lo contrario, los explantes a los que se aplicó ¾ de MS, mostraron vigor en los tallos y buen color de hojas, por lo tanto buena calidad para un repique posterior, demostrando, de esta manera, que solo con reducir la concentración de medio MS a ¾, se logra un mejor desarrollo de las plantas, a la vez de reducir costos.

Número de yemas. Las regresiones de niveles de macro nutrientes con niveles de BAP para el número de yemas, no mostraron diferencias estadísticas; alcanzando el punto más alto de 5.5 yemas/explante en ausencia de BAP; sin embargo estos explantes tenían un aspecto débil, de tallos muy delgados, pocas hojas y sin presencia de brotes, ya que

estos eran explantes únicos. Aplicando 1 mg de BAP (punto medio) en combinación de $\frac{1}{2}$ de macronutrientes, se obtuvo en promedio 5 yemas/explante, y con 1 mg de BAP con $\frac{3}{4}$ de macro-nutrientes, se obtuvo 4.5 yemas, estas últimas presentaron un aspecto muy bueno de calidad, con tallos más gruesos, vigorosos y con varias hojas y brotes.

Marulanda *et al.* (2000), trabajando con cuatro variedades de frambuesa *in vitro*, en medio Anderson y utilizando 2.0 mg/l de BAP, obtuvieron 3.6 a 3.8 yemas/explante, datos que comparados a la presente investigación son bajos. Cisne *et al.* (2004), obtuvo con 2.5 mg/l de BAP, un promedio de 4.13 yemas y 3.13 hijos.

Los efectos de los macro nutrientes se reflejaron más en las características morfológicas y fisiológicas que estadísticas, (la presente investigación no se basó en puntos máximos de las variables) pues a menor nivel se observaron explantes de hojas amarillas, con tallos débiles debido a deficiencias, por lo que su uso es importante para la nutrición y obtención de explantes de calidad.

FASE DE ENRAIZAMIENTO

Número y tamaño de raíces. Las dos auxinas tuvieron efectos similares, no se observaron diferencias estadísticas, sin embargo se observaron diferencias en cuanto al aspecto de las raíces. AIA presentó raíces delgadas, débiles y pocas raíces secundarias; por el contrario AIB produjo raíces más gruesas, uniformes y fuertes (Figura 3).

El mayor número de raíces alcanzado fue de 9.5 en aplicación del nivel más alto, en este caso 1 mg/l indistintamente de la auxina. El incremento de concentración de las auxinas indujo a la proliferación de

raíces. Davies (1988), observó que en los medios donde la emisión de raíces era escasa, no existía auxina y se producía raíces de gran longitud. Por el contrario, allí donde se producía un gran número de raíces, por efecto de la auxina, eran de menor longitud, por acción de la auxina como inhibidor de elongación de raíces, características que también se observó en la presente investigación.

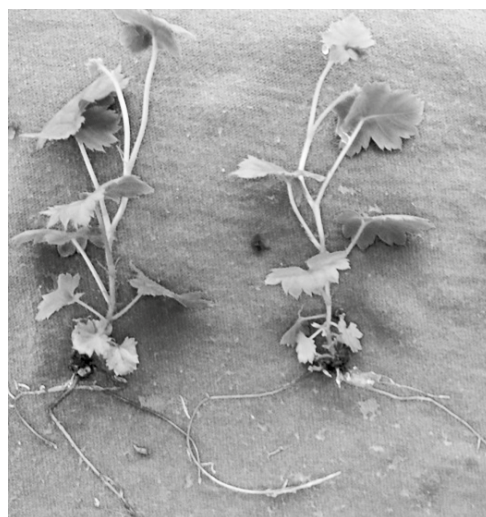


Figura 3. Arriba: plantas en las que se aplicó AIB. Abajo: plantas con AIA

El aumento de concentración de auxinas, provoca un efecto estimulador de raíces

hasta un cierto valor, a partir del cual un incremento tiene un efecto inhibitorio (Fachinello *et al.*, citados por Centellas 1996).

Porcentaje de enraizamiento. Para el enraizamiento se encontró que el comportamiento de AIB, en los tres primeros niveles (0.25 - 0.5 - 0.75 mg/l) mantienen un 100%, superando a AIA que alcanzó 93.5% (Figura 4).

En resumen, ante la respuesta obtenida entre los niveles de MS y niveles de auxinas, en la mayoría de los tratamientos los explantes enraizaron, esto sin considerar el tratamiento al que fueron sometidos pues las diferencias son muy pequeñas.

En el caso de las concentraciones de AIB, se realizaron estudios de enraizamiento en diferentes especies de *Rubus*, bajo la aplicación de 1 y 3 mg/l, obteniendo también resultados positivos (Cisne *et al.* 2004).

Conclusiones

FASE DE MULTIPLICACIÓN

- El mayor número de brotes obtenido fue de 7 y la mayor tasa de multiplicación fue de 8.28 explantes, utilizando 1 mg/l de BAP.
- La mejor calidad de brote (4.5 yemas de 1.7 cm aproximadamente) se obtuvo aplicando la combinación de 0.5 mg/l de AG3 con $\frac{3}{4}$ de macro nutrientes.

FASE DE ENRAIZAMIENTO

- El 100% de enraizamiento se alcanzó utilizando AIB.
- El mayor número de raíces fue de 9.5 trabajando con 0.75 mg/l de este fito regulador, en combinación con 1 mg/l de macro nutrientes.

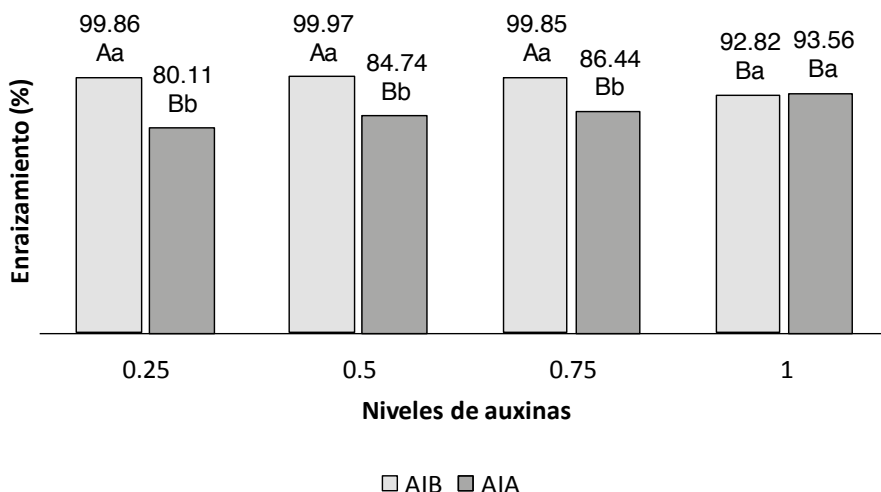


Figura 4. Efecto de los niveles de auxinas para el porcentaje de enraizamiento en función a los niveles de auxinas

Medias seguidas de la misma letra (minúscula para los niveles de auxinas y mayúscula para las auxinas), no difieren entre sí por el test de Duncan al 5% de probabilidad.

Referencias citadas

- Altamirano S. 2009. Especies de la Familia Rosaceae Género *Rubus*. Libro Rojo de Parientes Silvestres de Cultivos de Bolivia. Editorial PLURAL. La Paz, Bolivia. 223 p.
- Beck S. 2003. La flora de Bolivia y la importancia de los herbarios para su conocimiento. Libro Rojo de Parientes Silvestres de Cultivos de Bolivia. Editorial PLURAL. La Paz, Bolivia. 223 p.
- Centellas A. 1996. Micropropagación de manzano (*Malus domestica* Borkh). Tesis M.Sc. Universidad Federal de Pelotas. Rio Grande, Brasil. 64 p.
- Cisne J., Muñoz L., Reyes H. 2004. Reguladores de crecimiento, l-Cisteína y ácido ascórbico en el cultivo *in vitro* de mora (*Rubus glaucus* Benth). Programa de Recursos Genéticos Nicaraguenses. Nicaragua. 4 p.
- Davies D. 1980. Rapid propagation of roses *in vitro*. Scientia Horticulturae. 13: 385 - 398.
- Forni R., Pasqual M. 1996. Influencia de citoquininas, BAP y concentraciones de los componentes del medio "MS" en la micro propagación de café "Catuai". Lavras. Brasil. pp. 468-474.
- Loayza E. 2008. Determinación de la concentración óptima de Bencilaminopurina (BAP) e Hipoclorito de Sodio para la propagación *in vitro* de tres quimiotipos de *Mentha piperita* var. *piperascens*. Tesis Licenciatura. UMSS, FCAyP. Cochabamba, Bolivia. 76 p.
- Marulanda M., Carvajalino M., Vento H. 2000. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de plantas seleccionadas de *Rubus glaucus* Benth para el departamento de Risaralda. Risaralda, Colombia. pp. 6-8.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. Copenhagen. Denmark. v. 15, pp. 473- 497.
- Villa F., Araujo A., Pio L., Pasqual M. 2005. Multiplicación *in vitro* de mora "Ebano" en diferentes concentraciones de medios MS y BAP. Ciencia e Agrotecnología. Lavras. v. 29, nro. 3, pp. 582-589.

Trabajo recibido el 24 de agosto de 2017 - Trabajo aceptado el 8 de septiembre de 2017