

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

**ESTABLECIMIENTO *in vitro* Y MICROPROPAGACIÓN DE
FRAMBUESA (*Rubus idaeus* L.) UTILIZANDO MEDIO SEMISÓLIDO Y
MEDIO LÍQUIDO EN RITA®.**

FIGURELLA JONES CASTRO

CARTAGO, 2006

**ESTABLECIMIENTO *in vitro* Y MICROPROPAGACIÓN DE
FRAMBUESA (*Rubus idaeus* L.) UTILIZANDO MEDIO SEMISÓLIDO Y
MEDIO LÍQUIDO EN RITA®.**

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica por Fiorella Jones Castro como requisito parcial para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.

M.Sc. Dora María Flores Mora
Escuela de Biología
Instituto Tecnológico de Costa Rica
Profesora Asesora

M.Sc. Vilma Jiménez Bonilla
Escuela de Biología
Instituto Tecnológico de Costa Rica
Lectora

Dra. Ana Abdelnour Esquivel
Escuela de Biología
Instituto Tecnológico de Costa Rica
Lectora

DEDICATORIA

A mis padres por su ayuda, apoyo, comprensión y paciencia durante todos estos años.

A mi hermana por su compañía, ayuda y positivismo.

AGRADECIMIENTOS

A Jehová Dios por su bendición y ayuda a través de los años y en este proyecto.

A mi familia por toda su paciencia y apoyo a lo largo de toda mi vida.

A mis amigos por ayudarme a tomar los momentos difíciles con humor.

A mi tutora M.Sc. Dora Flores por su ayuda, asesoría y disposición durante la realización de este proyecto.

A la profesora M.Sc. Vilma Jiménez por su colaboración durante la elaboración de esta práctica.

A Montserrat Jarquín, Ana Patricia Guzmán y a todo el personal del CIB que laboró durante el tiempo de mi estancia y me ayudaron en la ejecución de este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Justificación.....	4
Revisión de Literatura.....	7
<i>Rubus Idaeus</i> L.....	7
Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos.....	11
Objetivos.....	19
Objetivo General.....	19
Objetivos Específicos.....	19
Materiales y Métodos.....	20
Localización de la investigación.....	20
Obtención del Material Vegetal.....	20
Manejo del material vegetal en invernadero.....	20
Ensayo de Establecimiento <i>in vitro</i>	21
Ensayo de Micropropagación.....	24
Resultados.....	27
Ensayo de Establecimiento <i>in vitro</i>	27
Ensayo de Micropropagación.....	30
Discusión.....	32
Ensayo de Establecimiento <i>in vitro</i>	32
Ensayo de Micropropagación.....	36
Conclusiones y Recomendaciones.....	38
Conclusiones.....	38
Recomendaciones.....	39
Bibliografía.....	40
Anexos.....	45

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N°	Título	Pág.
1	Tratamientos de desinfección y pH del medio de cultivo empleados para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Rubus idaeus</i> L.....	23
2	Tratamientos y medio de cultivo empleados para la micropropagación <i>in vitro</i> de <i>Rubus idaeus</i> L.....	24
3	Porcentajes de sobrevivencia, oxidación y contaminación para los tratamientos de desinfección empleados.....	27
4	Promedio de longitud, número de ejes y nudos para los dos tratamientos de micropropagación realizados.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°	Título	Pág.
1	Principales abastecedores de frambuesa para el Hemisferio Norte.....	5
2	Planta de Frambuesa roja (<i>Rubus idaeus</i> L.).....	7
3	Frambuesa roja (<i>Rubus idaeus</i> L.) A) Flor. B) Fruto.....	8
4	Recipiente para Inmersión Temporal Automático.....	16
5	Plantas de frambuesa en condiciones de invernadero.....	21
6	Porcentaje de contaminación para los tres tratamientos de desinfección realizados.....	28
7	Porcentaje de oxidación para los tres tratamientos de desinfección realizados.....	28
8	Porcentaje de sobrevivencia para los tres tratamientos de desinfección realizados.....	29
9	Promedios de longitud (cm) para los dos tratamientos de micropropagación realizados.....	30
10	Plántulas de frambuesa en RITA® después de un mes en el cuarto de crecimiento.....	31
11	Plántulas de frambuesa al finalizar un mes de crecimiento. A) Medio semisólido. B) RITA®	31
12	Explantos en el cuarto de crecimiento A) etapa inicial B) 1 semana. C) 2 semanas D) 3 semanas, después de la introducción.....	35

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N°	Título	Pág
1	Análisis Estadístico: Establecimiento <i>in vitro</i>	45
2	Análisis Estadístico: Ensayo de Micropropagación.....	50

**ESTABLECIMIENTO *in vitro* Y MICROPROPAGACIÓN DE FRAMBUESA
(*Rubus idaeus* L.) UTILIZANDO MEDIO SEMISÓLIDO Y MEDIO LÍQUIDO
EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL.**

FIORELLA JONES CASTRO*

RESUMEN

Para el establecimiento *in vitro* de la frambuesa se realizaron pruebas con tres tratamientos, la mayor sobrevivencia (45%) se obtuvo con una desinfección superficial de 6g/l Agri-mycin® y Bisolex® y 5g/l Ferbam® durante 60min, seguida de una exposición a CaClO₂ 3,5% por 15min en bomba al vacío.

Se probaron dos sistemas para la micropropagación, el medio semisólido y el medio líquido en inmersión temporal, utilizando medio de cultivo M&S complementado con BAP, AG₃ y ácido ascórbico, con un pH de 5.5.

Las pruebas en medio semisólido presentaron buenos resultados en brotación y crecimiento. En el sistema de inmersión temporal los resultados fueron similares sin embargo los explantes se observaron más vigorosos.

Los análisis estadísticos no revelaron diferencias significativas entre estos tratamientos, aun así deben realizarse pruebas adicionales con el fin de optimizar el sistema de inmersión temporal.

Palabras clave: *Rubus idaeus* L., establecimiento *in vitro*, micropropagación, inmersión temporal, medio semisólido.

*INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2006.

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, siendo de interés, además, para la agroindustria (CORFO,1982; Ciravegna *et al*, 2004).

Recientemente se han identificado sus propiedades medicinales como antirreumático, tónico, antiescorbútico, astringente, depurativo y diurético (Ciravegna *et al*, 2004), e incluso anti-carcinógeno (Xue *et al*, 2001), 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).

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 interés por el uso de la técnica de cultivo de tejidos para su propagación (Mendel, 1989).

La micropropagación permite reproducir *in vitro* cientos de clones de una misma especie (Kyte & Kleyn 1996). Tiene un gran potencial comercial debido a la velocidad con la que se realiza la propagación, aunado a esto las plántulas obtenidas, son de alta calidad, presentan buena vigorosidad y se encuentra libres de enfermedades (Amhed *et al*, 2001).

Los explantes *in vitro* se encuentran en condiciones ambientales muy diferentes a las plantas cultivadas en el campo y se alimentan de manera heterotrófica del medio de cultivo (Kyte & Kleyn 1996), por lo cual una adecuada selección es de vital importancia para el éxito del procedimiento. El medio de cultivo utilizado puede ser semisólido o líquido, según el objetivo que se defina y los recursos disponibles.

En la actualidad se favorece el desarrollo de métodos para la micropropagación que utilizan *medios líquidos*, los cuales son más baratos. Además permiten el escalonamiento de la micropropagación mediante el uso de sistemas estacionarios o en agitación, así como biorreactores o sistemas de inmersión temporal (Eide *et al*, 2003).

Este proyecto tuvo como objetivo el desarrollo de un protocolo para el establecimiento *in vitro* y la micropropagación de la frambuesa. Se realizó una comparación entre el uso del método tradicional en medio semisólido y la técnica de inmersión temporal en la micropropagación, con el fin de determinar las diferencias en el desarrollo de las plántulas y la cantidad de brotes obtenidos al finalizar el ciclo.

JUSTIFICACIÓN

La frambuesa es en la actualidad un producto de interés en diversos mercados, debido a su exquisito sabor y propiedades benéficas para la salud. En los países del norte de Europa y los Estados Unidos, su demanda se ha incrementado notablemente en los últimos veinte años, al igual que su producción, ya que es muy apetecido en los países del hemisferio norte como producto culinario de lujo, y como materia prima en la elaboración de productos de consumo diario, como jaleas, reposterías y refrescos (PROEXANT, 2004).

Para los años 80 la producción de frambuesa roja en Europa era de 966 toneladas métricas anuales, siendo este el mayor productor a nivel mundial (CORFO, 1982). Para 1995 el mercado Europeo realizaba transacciones de más de 13,000 toneladas de producto fresco para consumo (aproximadamente \$18 millones), y de casi 60,000 toneladas por productos procesados (aproximadamente \$96 millones), principalmente provenientes de Holanda, Alemania e Inglaterra (Infoaserca, 2004).

En la actualidad el comercio internacional de frambuesas frescas es de aproximadamente 120 millones de dólares. El principal país importador de frambuesas es EEUU con el 30% del mercado; por su parte la Unión Europea y Canadá suman más del 60% de las compras mundiales.

Los mayores exportadores son España, EEUU, Chile y Canadá, aportando entre los cuatro el 76% de las exportaciones. Sin embargo, tanto EEUU 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 frambuesa es muy rentable en cultivos de mediano tamaño. Su precio durante los últimos cinco años a oscilado entre los \$5 y \$15 por kilogramo en el mercado internacional, en algunos países alcanza hasta \$21 el kilo según la calidad y la exigencia del mercado (Ciravegna *et al*, 2004).

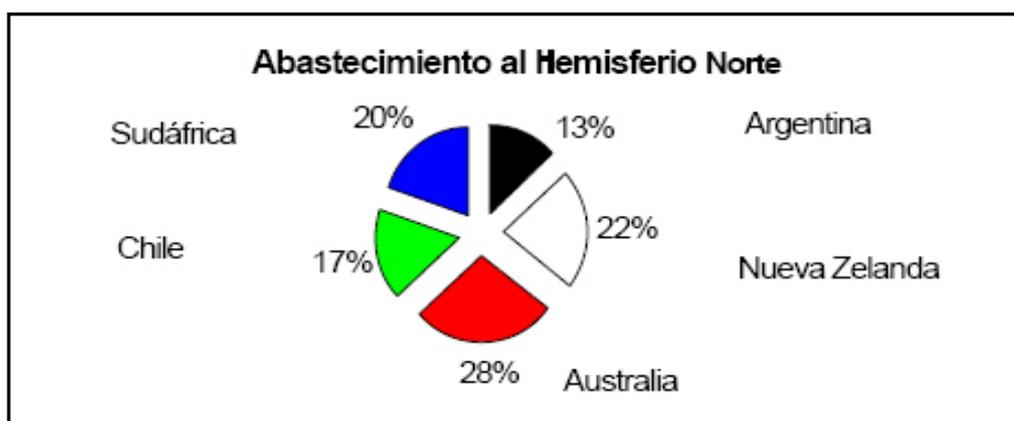


Figura 1. Principales abastecedores de frambuesa para el Hemisferio Norte.
Tomado de Ciravegna *et al*, 2004.

Considerando los aspectos económicos y la demanda actual del producto, la micropropagación de frambuesa es una opción deseable para acelerar la producción masiva, el proceso de cultivo y obtención de cosecha y así asegurar el mantenimiento de variedades de excelente rendimiento y la calidad del producto.

Sin embargo las técnicas tradicionales de propagación *in vitro* requieren de altos costos en infraestructura, mano de obra y reactivos, por lo cual se busca en la actualidad métodos masivos que permitan automatizar el proceso productivo, reducir los costos y generar igual o mayor cantidad de plantas. Los sistemas que emplean medio líquido entre ellos el de inmersión temporal se perfilan como una respuesta a estos desafíos.

Por lo tanto realizar una investigación sobre las distintas técnicas de micropropagación (medio semisólido y medio líquido) para la frambuesa es importante, con el fin de establecer protocolos de multiplicación con miras a la producción masiva que permitan a países como Costa Rica acceder los mercados de forma competitiva.

REVISIÓN DE LITERATURA

Rubus idaeus L.

Descripción Botánica

La frambuesa pertenece a la subclase Arquiclamidia, Familia de las Rosaceas, orden de los Rosales y al género *Rubus*. Existen decenas de especies e híbridos de interés comercial, entre los más destacados se encuentran la mora (*R.constrictus*), la zarzamora (*R.ulmifolius*), la mora inerme (*R.canadiensis*), la mora espinosa (*R.argutus*), la frambuesa púrpura (*R.neglectus*), la frambuesa negra (*R. Occidentales*), la frambuesa amarilla (*R.ellipticus*) y la frambuesa roja (*R.idaeus*) (CORFO, 1982).



Figura 2.Planta de frambuesa roja (*Rubus idaeus* L.).

La frambuesa roja (Figura 2) es una dicotiledónea, estolonífera de tallo erecto cubierto de espinas curvas vigorosas y pequeñas. La duración del tallo es bianual y puede alcanzar alturas mayores a los dos metros. Durante el primer año de su desarrollo se da la diferenciación de yemas florales, y durante el segundo año florecen y fructifican, muriendo después de la maduración de los frutos (CORFO, 1982; PROEXANT, 2004).

El sistema radicular se extiende a poca profundidad, es perenne, fasciculado, de desarrollo horizontal con abundantes ramificaciones y posee tanto raíces primarias como secundarias leñosas (CORFO, 1982; PROEXANT, 2004).

Las hojas son sencillas, alternas, compuestas y estipuladas, formadas por 5 a 7 folíolos ovalados y doblemente aserradas, de color verde tenue en la cara inferior e intenso en la superior. Presentan vellosidad de textura algodonosa (PROEXANT, 2004).

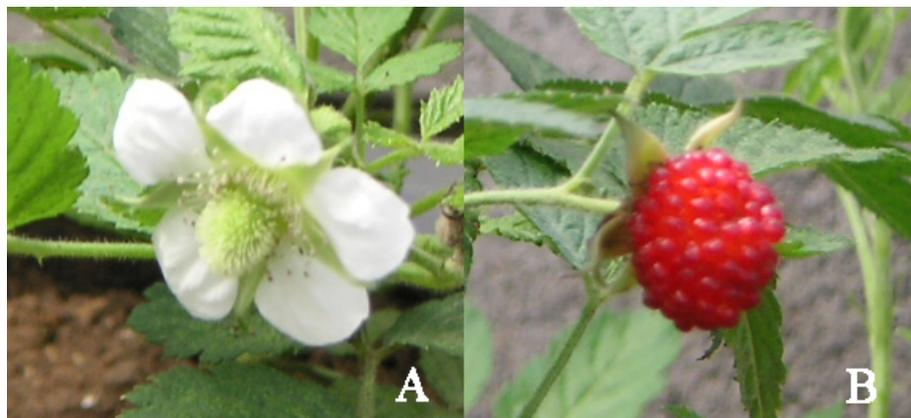


Figura 3. Frambuesa roja (*Rubus idaeus* L.) A) Flor. B) Fruto.

Sus flores (Figura 3) son terminales y axilares, las yemas florales y los pecíolos están cubiertos por un fino vello no glandular y espinas. Son perfectas, rara vez dioicas, de cuatro o cinco pétalos color blanco o rosado, son hermafroditas, estipuladas, con cáliz pubescente. Los estambres se encuentran dispuestos en la base del receptáculo (PROEXANT, 2004).

Los frutos (Figura 3) corresponden a polidrupas de color rojo de forma esférica o cónica de 2,5 a 4,0 gramos como peso promedio. Se encuentran unidas al receptáculo débilmente por lo que se desprenden con facilidad (CORFO, 1982).

Características del Cultivo

Tradicionalmente la propagación de la frambuesa se realiza por multiplicación de hijuelos o por raíces. El uso de hijuelos es el método más empleado debido a que estos se extraen fácilmente y se plantan directamente, en tanto que al utilizar raíces se requiere la inducción de brotes, por lo que el cuidado debe ser mayor, sin embargo permite obtener más cantidad de plantas (Ciravegna *et al*, 2004).

El cultivo de la frambuesa necesita de un clima templado, con veranos frescos y húmedos, ya que tanto la brotación como la pérdida de hojas están ligados al cambio de temperatura y el fotoperíodo. La alta humedad relativa es necesaria para el buen crecimiento de los frutos, debido a que contribuye a la proliferación foliar alrededor de las flores tempranas, asegurando un mejor desarrollo (CORFO, 1982).

La frambuesa demanda suelos ricos en materia orgánica de textura media, frescos, prácticamente libres de calcio activo (Ciravegna *et al*, 2004). No son recomendables suelos en los que se hayan cultivado con anterioridad solanáceas. Además la composición química del suelo debe ser ajustada a los requerimientos de las plantas pues estas son muy sensibles a las deficiencias de bases como potasio y magnesio (Mendel, 1989). Un pH ideal para el cultivo es de alrededor de 6,5 (Ciravegna *et al*, 2004).

Estas características se presentan en varias zonas productoras de Costa Rica, lo cual da la posibilidad de desarrollar este producto agrícola en el país, donde es común encontrarla de forma silvestre en las zonas altas.

Principales Enfermedades

La frambuesa se ve afectada principalmente por enfermedades fungosas particularmente, *Elsinoe veneta*, *Leptosphacteria coniothyrium*, *Septoria spp.*, *Dydimella applanata* y *Botrytis cinerea* (CORFO,1982). La *Botrytis cinerea* es la responsable de grandes pérdidas de fruto. Se manifiesta en la época de maduración como una mancha amarillenta blancuzca pequeña en el fruto, se extiende rápidamente y contamina todo el fruto y sus alrededores.

La frambuesa roja también se ve atacada por virus, entre los que destaca el RBDV (Raspberry Bushy Dwarf Virus) el cual se transmite mediante semilla y polen, y provoca múltiples síntomas en las plantas, como reducción en la altura de los tallos, clorosis, fruta de baja calidad y disminución de la cosecha (Strik & Martin, 2003).

Se encuentran igualmente atacadas por TomRSV (Tomato Ringspot Nepovirus), and TSV (Tobacco Streak Ilarvirus), estos se transmiten por semilla y producen manchas cloróticas evidentes en las hojas jóvenes, reducción en el crecimiento de las plantas y la cosecha.

Se ha reportado que la presencia de estos virus en la plántula reduce la tasa de multiplicación *in vitro* de *Rubus spp* (Tsao *et al*, 2000).

Cultivo *in vitro* de tejidos.

Generalidades

El cultivo *in vitro* de tejidos es una técnica basada en la totipotencia de la célula vegetal y su capacidad regenerativa. El procedimiento consiste en tomar los explantes apropiados de una planta madre y propiciar su crecimiento en un medio con los nutrientes necesarios para su desarrollo, en condiciones de humedad, temperatura e iluminación controladas.

Para la implementación de esta técnica se reconocen cuatro etapas: (1) introducción del material; (2) multiplicación o micropropagación de los brotes obtenidos; (3) enraizamiento; (4) aclimatación. Luego se procede a trasladar el material a campo (Fontúrbel, 2002).

La selección del medio de cultivo adecuado es un factor determinante dentro del proceso. Un medio balanceado es necesario para el desarrollo de los explantes. Este debe disponer de los nutrientes orgánicos e inorgánicos básicos para toda planta en concentraciones apropiadas. Deben incluirse los *macroelementos* (C, K, N, P, H, O, S, Mg y Ca) y los *microelementos* (Fe, Zn, Cl, Cu, Mo, B y Mn).

Además de la adición de *vitaminas, fuentes de nitrógeno, carbono y hierro* (Murashige & Skoog, 1962).

Muchas especies requieren para un desarrollo óptimo de la adición de reguladores de crecimiento, estos son compuestos orgánicos que se emplean en pequeñas cantidades estimulan una respuesta fisiológica. Entre estos se encuentran las auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno.

Las giberelinas son sustancias promotoras del crecimiento, provocan la elongación de los tallos debido al alargamiento de las células más que a un incremento de la división celular, ya que aumentan la extensibilidad de la pared celular (Soberón *et al*, 2005).

Las citocininas son un grupo de reguladores del crecimiento que influyen en la división celular, que se derivan de adenina o aminopurinas. Entre ellas se encuentra el BAP o benzil-aminopurina. Entre sus efectos fisiológicos se destacan: la promoción de la división celular, la formación y crecimiento de brotes laterales, la maduración de los cloroplastos, la movilización de nutrientes hacia las hojas y retraso de la senescencia (Soberón *et al*, 2005).

Establecimiento *in vitro*

El establecimiento o introducción, consiste en la selección adecuada del explante y su desinfección para evitar la contaminación por patógenos (bacterias, hongos y levaduras). Estos afectan el crecimiento y desarrollo del explante (Fontúrbel, 2001), compiten con él por los nutrientes del medio, deteriorándolo hasta provocar su muerte.

Los explantes pueden ser de distintos tipos desde porciones de tejido hasta células sueltas, granos de polen, semillas, protoplastos, entre otros. Este dependerá de la especie de interés y los objetivos de su propagación. Para obtener clones de la planta madre o mantener características particulares, se prefiere utilizar tejidos con alta estabilidad genética como meristemos apicales y yemas axilares (Fossard, 1999, citado por Fontúrbel, 2002).

Una vez seleccionado el explante, se procede a la desinfección. Se utilizan distintos desinfectantes, por lo general de acción superficial, como bactericidas y fungidas de contacto, hipoclorito de sodio o calcio, en disoluciones.

La reacción de los ácidos hipoclorosos y el cloro residual con el agua producen la oxidación de los grupos -SH, grupos aminos, hidroxifenol de la tirosina y grupos índoles, lo cual destruye las proteínas y ácidos nucleicos de los microorganismos, sin embargo puede provocar la oxidación de los tejidos vegetales (Auccasi, 2003; Salisbury & Ross, 1992), por lo que estos se aplican en bajas concentraciones y con tiempos de exposición específicos, según las características del tejido y el grado de contaminación.

Finalizado este proceso, los explantes son trasladados a una cámara de flujo laminar (con aire filtrado, libre de microorganismos) donde se realiza la transferencia a un medio de cultivo apropiado (Kyte & Kleyn 1996) al tipo de especie.

Micropropagación

La micropropagación como técnica consiste en la producción de un número determinado de plantas idénticas a partir de un mismo explante. Permite optimizar la obtención de clones con características deseables como resistencia, producción elevada o alta calidad, en un menor tiempo. Además al realizar este proceso en laboratorios e invernaderos donde se dispone de condiciones controladas, es posible producir plantas durante todo el año independientemente de la condiciones climáticas (Fontúrbel, 2002). También se facilita el manejo de plantas libres de enfermedades fungosas, bacterianas y virales (Fossard, 1999, citado por Fontúrbel, 2002).

A pesar de estas ventajas la micropropagación se ve limitada a un grupo de especies altamente rentables debido a que implica una inversión en infraestructura y mano de obra considerablemente elevada.

Medio semisólido

La técnica tradicional de cultivo de tejidos *in vitro* utiliza medio *semisólido*. En este sistema cada brote se mantiene en frascos individuales, los cuales se transfieren manualmente cada veinte o treinta días para evitar la alteración de las concentraciones de los nutrientes y el crecimiento excesivo de los brotes.

Existen cientos de plantas propagadas mediante este método, dentro de las cuales *Rubus spp.* constituye una de las especies arbustivas de mayor investigación, sus distintas variedades han sido ampliamente investigadas para desarrollar un sistema de micropropagación que permita maximizar la obtención de cientos de plantas a partir de un mismo explante. Existen variados medios y protocolos dependiendo de la planta que se trabaje. Por lo general el

medio utilizado debe complementarse con reguladores de crecimiento para obtener brotación de los explantes (Almeira y Contreras, 2004).

En mora y frambuesa algunos autores recomiendan el uso del medio semisólido M&S complementado con 4mg de BA y 0.25mM de IBA (ácido indol-3-butírico) (González *et al*, 2000).

Rubus chamaemorus o cloudberry ha sido multiplicada a partir de estacas utilizando medio semisólido M&S complementado con BA y IBA, con un pH de 4,0 (Thiem, 2003).

Para la propagación a partir de miniestacas de aproximadamente 1cm de longitud de mora de castilla (*R.glaucus*) en medio semisólido se ha recomendado el uso de M&S a la mitad, complementado con 1mg/l de BA (Almeida y Contreras, 2004).

Pese a su uso extensivo en este y otros géneros, el cultivo de tejidos en medio semisólido posee una serie de desventajas, conlleva gastos en mano de obra entre el 65% y 85% del total de costos del proceso (Eide, 2003), debido a la necesidad de mantener gran cantidad de frascos y un número importante de personal para la preparación periódica de medios y el manejo de los brotes (Quiroga, 2005). Además los gelificantes representan un componente del medio de cultivo de un alto costo.

Debido a estas limitantes el proceso de escalamiento en el cultivo de tejidos es un paso indispensable para el desarrollo de una industria productiva de material vegetal.

Medio líquido

Los sistemas que utilizan medio líquido se perfilan como una opción interesante en este proceso ya que permiten una mayor automatización de la producción masiva de plantas.

Los *medio líquidos estacionarios o en agitación* pueden ser muy eficientes para algunas especies y poseen la ventaja de no requerir equipo sofisticado lo que abarata los costos de su implementación. La técnica que emplea medios en oscilación asegura una correcta aereación en comparación con los medios estacionarios (Kozai *et al*, 1995), cuya principal desventaja la constituye la hiperhidricidad en los explantes.

Los sistemas de *inmersión temporal* son una alternativa para evitar los problemas de aireación con el uso de medio líquido ya que no exponen el explante al medio nutritivo constantemente, sino que consisten en sumergir los explantes durante breves períodos de tiempo. Además al utilizar inyecciones frecuentes de CO₂ aumenta la vigorosidad de las plántulas incrementando su porcentaje de sobrevivencia y capacidad fotosintética durante la aclimatación (Quiroga, 2005).

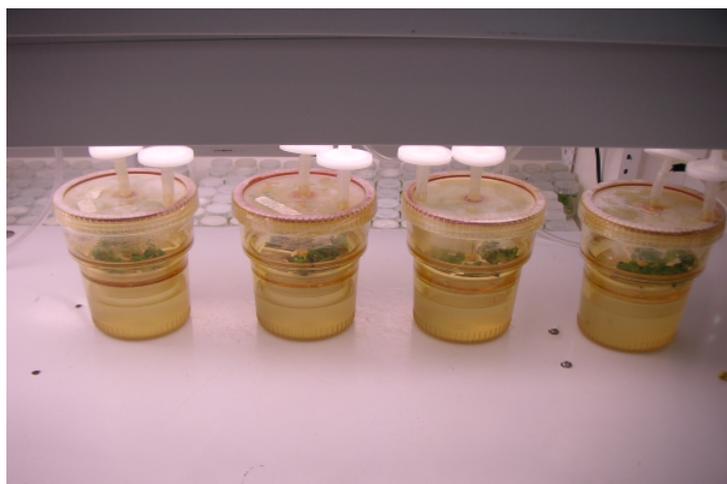


Figura 4. Recipientes para Inmersión Temporal Automático.

Existen diversos tipos de sistemas para la inmersión temporal, el más conocido y utilizado a nivel comercial es la RITA® (Recipiente de Inmersión Temporal Automático), diseñado en los noventa por Teisson y Alavard (Figura 4).

Este sistema consiste en un contenedor dividido en dos compartimentos, en el inferior se encuentra el medio de cultivo líquido y en el superior los explantes dispuestos sobre una redcilla. Al sistema se inyecta presión de aire a través de unidades de filtración, logrando que el medio de cultivo ascienda y entre en contacto con los explantes, cuando el suministro de aire se detiene el medio regresa al compartimiento inferior. Este proceso se lleva a cabo periódicamente, con una duración y frecuencia de inmersión controlada, evitando así la exposición constante del explante al medio de cultivo (Teisson y Alavard, 1994)

Varias especies se han adaptado con éxito a este nuevo sistema de micropropagación. Por ejemplo en banano la inmersión temporal ha sido exitosa empleando un periodo de inmersión de 3 minutos con una frecuencia de tres horas, utilizando medio M&S, complementado con BA 4mg/l (Daquinta *et al*, 2001). La cantidad de plántulas obtenidas en esta especie (*Musa spp.*) también aumenta significativamente. Mediante esta técnica fue posible la multiplicación inicial de embriones somáticos dándose un incremento de 100 a 250 explantes en 2 a 3 meses de haberse cultivado y la germinación de los mismos fue de 70 - 80%. (Teisson y Alavard, 1994)

En café se han disminuido los costos de operación y reactivos aplicando esta técnica. En un único recipiente RITA® con 200ml de medio líquido, pueden producirse hasta 9000 plantas de café. Los investigadores concluyeron que esa cantidad de material producida utilizando medio semisólido habría requerido 1500 frascos con 30ml de medio cada uno (Etienne *et al*, 1997). Para el cultivo de

café diferentes investigadores recomiendan periodos de cortos de exposición de los explantes al medio de cultivo (un minuto cada cuatro horas), para prevenir hiperhidricidad y estimular el desarrollo (Albarran *et al*, 2004).

En plantas como la caña de azúcar, la malanga y especies ornamentales también se han presentado resultados muy alentadores al utilizar este método, se lograron obtener plantas altamente competentes en la etapa de aclimatación con características y comportamientos similares a las propagadas vegetativamente, reduciendo costos en la producción (Escalona *et al*, 1998).

En *Rubus spp* se ha utilizado con éxito el sistema de inmersión temporal, obteniendo vitroplantas en menor tiempo y con mayor vigorosidad, al someter las microestacas a frecuencias cortas (Flores y Argüello, 2005; Quiroga, 2005).

Investigaciones recientes en *R. idaeus* L., indican que esta responde a los sistemas de inmersión temporal cuando se utilizan duraciones cortas de tres minutos (Quiroga, 2005). En Noruega laboratorios especializados en la micropropagación, utilizan biorreactores de dos litros de capacidad totalmente computarizados para la producción masiva (Eide *et al*, 2003). Sin embargo al igual que con el método tradicional cada especie requiere de condiciones particulares para su desarrollo y no todas responden adecuadamente al ser cultivadas en el medio líquido (Etienne y Berthouly, 2002).

OBJETIVOS

Objetivo General

Implementar un protocolo de propagación masiva *in vitro* de plantas de frambuesa.

Objetivos Específicos

- Desarrollar un protocolo de introducción para la frambuesa.
- Establecer un protocolo para la micropropagación de frambuesa empleando el medio semisólido.
- Realizar pruebas de micropropagación empleando dos técnicas el medio semisólido y el sistema de inmersión temporal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización de la investigación

La investigación se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), en la ciudad de Cartago.

Obtención del material vegetal

El material vegetal se obtuvo en las zonas de San Francisco de Dos Ríos y Carrizal de Alajuela.

Manejo del material vegetal en el invernadero

El material fue sometido a un régimen de desinfección semanal, con la aplicación de dos fungidas (Bisolex® y Ferbam®) y un bactericida (Agri-mycin®) en concentraciones de 6g/l cada uno.

Se llevó a cabo una fertilización foliar semanal aplicando Byfolan® en una concentración de 5ml/l.

El riego se realizó durante las mañanas de día de por medio según las necesidades de las plantas (Figura 5).

Los brotes sanos obtenidos se utilizaron para los ensayos de establecimiento *in vitro*.



Figura 5.Plantas de frambuesa en condiciones de invernadero.

Ensayo de Establecimiento *in vitro*

Se realizaron tres tratamientos de desinfección, cada uno con treinta explantes (uno por frasco). Cada tratamiento se repitió dos veces (Cuadro 1)

Las variables porcentaje de contaminación, oxidación y sobrevivencia, se evaluaron semanalmente.

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza, utilizando Microsoft Excel®.

Preparación del medio de cultivo

Se preparó un medio de cultivo M&S completo suplementado con 1.5mg/l de 6-bencilaminopurina (BAP), 30g/l de sacarosa y 3.5g/l de phytagel, con un pH de 5.7 o un pH de 5 según el tratamiento.

Se distribuyeron 20ml de medio de cultivo en frascos de vidrio para cultivo *in vitro* tipo Gerber®. Se autoclavaron por 25 minutos a 121.1°C y se refrigeraron una vez fríos.

Selección del explante

De las plantas madre en condiciones de invernadero, generalmente en estado vegetativo, se tomaron de tejido joven, sano y de buena apariencia, miniestacas de 2.6cm de longitud, que tuvieran como mínimo un nudo con una yema diferenciada.

Desinfección

Se realizó un lavado de las miniestacas con agua y jabón (antibacterial). Seguidamente se realizó una desinfección superficial con Agri-mycin®, Bisolex® y Ferbam® (este último se omitió en el primer tratamiento) por 45 a 60 minutos, en movimiento continuo en un agitador orbital marca Digisystem Lab Instrumentes Inc®. Luego se efectuaron tres lavados con agua destilada estéril en cámara de flujo laminar.

Posteriormente se procedió a desinfectar los explantes con Hipoclorito de Calcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 65 i.a) al 3.5% producto comercial, por 15 minutos en bomba al vacío (se omite en el primer tratamiento). Luego se realizaron tres lavados con agua destilada estéril en cámara de flujo laminar (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	si	15	5
C	6.0	6.0	5.0	60	3.5	Si	15	5

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

Siembra del explante

En placas petri autoclavadas, fueron retiradas las secciones oxidadas de cada estaca logrando una longitud aproximada de 2 o 3cm y luego se inocularon en el medio de cultivo, una estaca por frasco. Los frascos se taparon, sellaron con plástico y 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.

La incubación duró tres semanas, durante las cuales se realizaron evaluaciones semanales de los explantes. Luego de cada evaluación, el material contaminado fue retirado del cuarto de crecimiento.

Ensayo de Micropropagación

Para la micropropagación se utilizaron dos sistemas, 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 sembró con diez plántulas, para un total de treinta explantes. Cada RITA® equivalió a una repetición y el ensayo se repitió dos veces.

Cuadro 2. Tratamientos y medio de cultivo empleados para la micropropagación *in vitro* de *Rubus idaeus* L.

Tratamiento	Sistema	Frecuencia de inmersión	Medio de Cultivo			
			Medio Base	Reguladores	Gelificante	pH
A	Medio Semisólido	-----	M&S completo	BAP 2mg/l AG3 1mg/l Ácido ascórbico 100mg/l	3.5g/l phytagel®	5.5
B	Medio Líquido Inmersión Temporal (RITA®)	2min cada 12 horas	M&S completo	BAP 2mg/l AG3 1mg/l Ácido ascórbico 100mg/l	-----	5.5

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

Las variables evaluadas a los treinta días fueron: longitud de la plántula, número de ejes obtenidos por explante, número de nudos por vitroplántula. 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 suplementado con 2mg/l de 6-bencilaminopurina (BAP), 1mg/l de ácido giberélico (AG₃), 100mg/l de ácido ascórbico, 30g/l de sacarosa y 3.5g/l de phytigel, con un pH de 5.5.

Se distribuyeron 20ml del medio en frascos de vidrio para cultivo *in vitro* tipo Gerber®. Se autoclavó por 25 minutos a 121.1°C y se refrigeró una vez enfriado.

Selección y siembra de las plántulas

De la etapa de establecimiento *in vitro* se seleccionaron 30 individuos sanos que presentaran buena apariencia, un tamaño mínimo de entre 1cm a 2cm, generalmente con dos hojas completamente desarrolladas.

Se inoculó en el medio de cultivo una plántula por frasco. Los frascos se taparon y sellaron con plástico y se colocaron en el cuarto de crecimiento a una temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con una luminosidad de 2000 lux y un fotoperíodo de 16 horas luz.

Una vez transcurrido un mes se llevó acabo la evaluación de las variables determinadas.

Medio Líquido en Inmersión Temporal

Preparación del medio de cultivo

Se preparó un medio de cultivo M&S completo suplementado con 2mg/l de 6-bencilaminopurina (BAP), 1mg/l de ácido giberélico (AG₃), 100mg/l de ácido ascórbico, 30g/l de sacarosa, con un pH de 5.5.

Se distribuyeron 250ml del medio en tres RITA[®]s. Se autoclavó por 25 minutos a 121.1°C y se realizó la inoculación de los explantes una vez enfriado.

Selección y siembra de las plántulas

De la etapa de establecimiento *in vitro* se seleccionaron 30 vitroplantas sanas que presentaran buena apariencia, un tamaño mínimo de entre 1cm a 2cm, generalmente con dos hojas completamente desarrolladas.

Las RITA[®]s se inocularon en cámara de flujo laminar colocando diez explantes por recipiente. Se sellaron con plástico y se colocaron en el cuarto de crecimiento, conectados a un compresor de aire automatizado, a una temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 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.

Después de un mes se llevo acabo la evaluación del ensayo.

RESULTADOS

Ensayo de Establecimiento *in vitro*

Los resultados obtenidos para los tratamientos de desinfección realizados en el establecimiento *in vitro* de la frambuesa se resumen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Porcentajes de sobrevivencia, oxidación y contaminación para los tratamientos de desinfección en *Rubus idaeus* L.

Tratamientos	Sobrevivencia	Oxidación	Contaminación		
			Hongo	Bacteria	Total
A 2g/1 A&B, 45min, 3,5% CaClO ₂ 15min sin bomba al vacío	25.00%	10.00%	18.33%	46.67%	65.00%
B 5g/1 A&B y 3,5g/1 F, 60min, 3,5% CaClO ₂ 15min bomba al vacío	33.33%	8.33%	48.33%	10.00%	58.33%
C 6g/1 A&B y 5g/1 F, 60min, 3,5% CaClO ₂ 15min bomba al vacío	45.00%	3.33%	41.67%	10.00%	51.67%

A: Agri-mycin®

B: Bisolex®

CaClO₂: Hipoclorito de Calcio

F: Ferbam®

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

El análisis de varianza (Anexo 1) de estos tratamientos revela que no existe una diferencia significativa para el porcentaje de contaminación total obtenido entre los tratamientos A y B, pero si una alta diferencia significativa entre A y C. El tratamiento A presenta un 65% de contaminación total, un 46.67% fue causada por bacterias. Para el tratamiento C se observa un 51.67% de contaminación total, un 10% se debió a la presencia de bacterias (Cuadro 3, Figura 6).

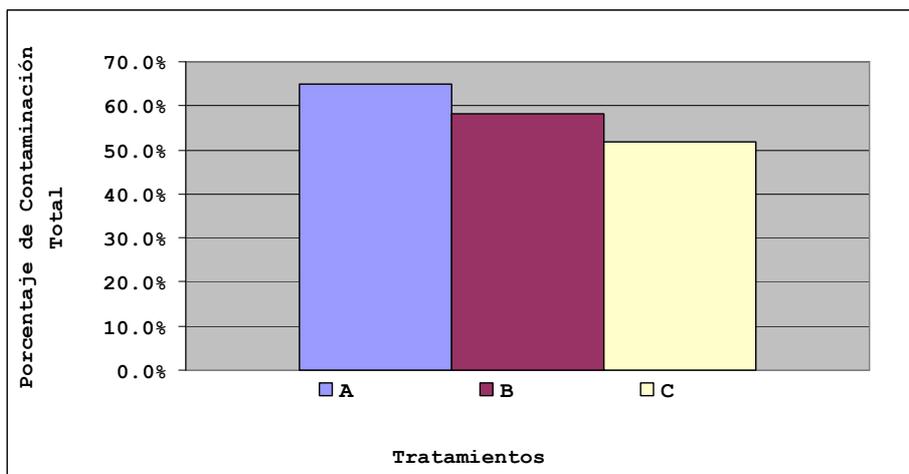


Figura 6. Porcentaje de contaminación total para los tratamientos de desinfección realizados

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

En relación con la contaminación fungosa se observa que para el tratamiento A fue de un 18,33%, mientras que para el tratamiento C fue de un 41.67% del total de explantes (Cuadro 3).

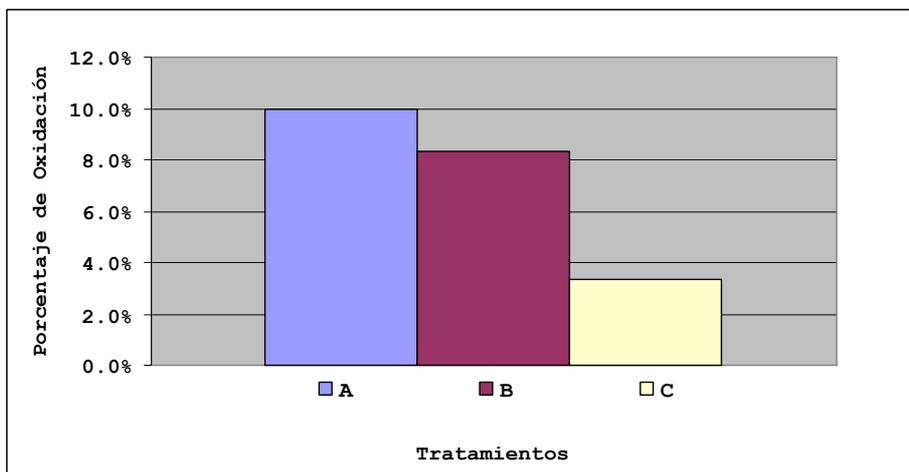


Figura 7. Porcentaje de oxidación para los tratamientos de desinfección realizados

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

El porcentaje de oxidación del tratamiento C posee alta diferencia significativa con respecto a los otros tratamientos, es el menor con un 3.33% del total de los explantes (Figura 7).

El tratamiento C exhibe el mayor porcentaje de sobrevivencia con un 45%, el tratamiento B un 33.33% y el C un 25% (Figura 9).

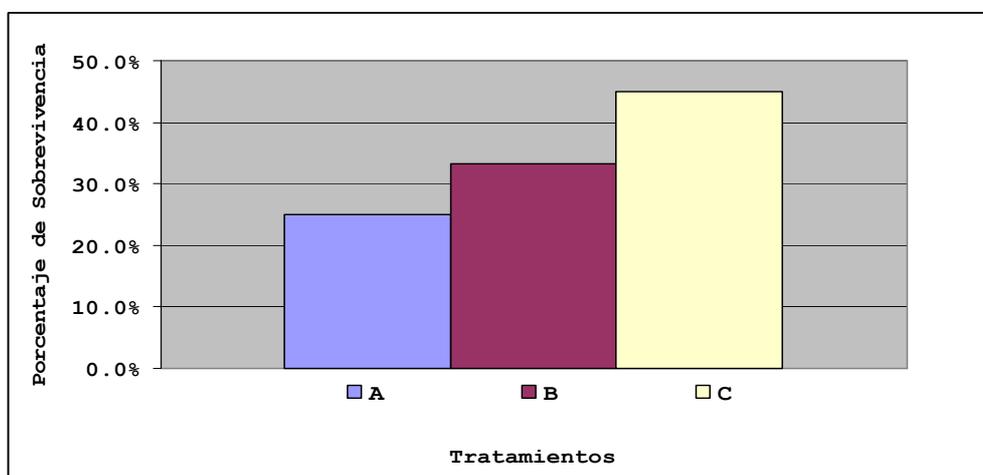


Figura 8. Porcentaje de sobrevivencia para los tres tratamientos de desinfección realizados

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

Ensayo de Micropropagación

Los resultados obtenidos para los dos sistemas de micropropagación se resumen en el Cuadro 4.

Cuadro 4. 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

Los resultados obtenidos para las tres variables, longitud número de ejes y número de nudos por explante, fueron similares para los dos sistemas, la comparación de medias realizada (Anexo 2) 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 (2.15cm) (Figura 9).

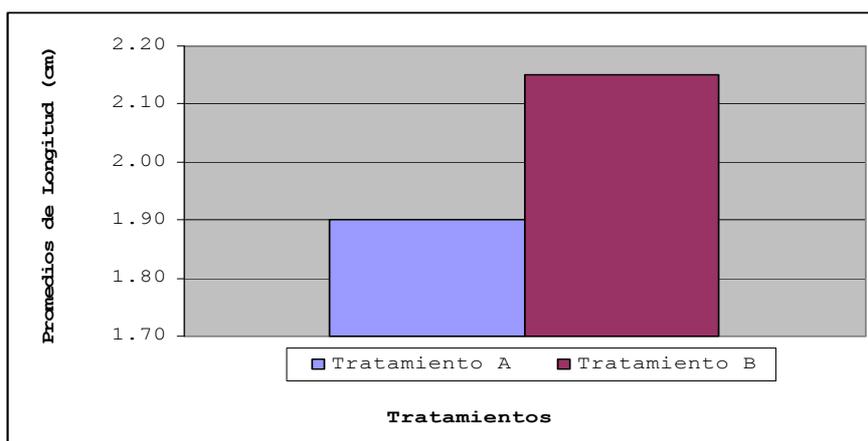


Figura 9. Promedios de longitud de las vitroplantas en los dos sistemas de micropropagación utilizados

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

En la figura 10 se observan las plántulas después de un mes de estar en la RITA® y en la figura 11 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.



Figura 10. Plántulas de frambuesa en RITA® después de un mes en el cuarto de crecimiento.

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



Figura 11. Plántulas de frambuesa al finalizar un mes de crecimiento. A) Medio semisólido. B) RITA®.

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

DISCUSIÓN

Ensayo de Establecimiento *in vitro*

Para el ensayo de establecimiento *in vitro*, el tratamiento C mostró el mayor porcentaje de sobrevivencia, consecuencia directa de la disminución en la oxidación y la contaminación del material.

Para el establecimiento *in vitro* de una planta se deben considerar una serie de factores que influyen en la respuesta que se obtenga. Algunos de ellos se mencionan a continuación: la época del año, el estado fisiológico de la planta, el tipo de explante a utilizar y el tratamiento previo a su introducción al laboratorio.

El estado fisiológico de las plantas madre que se mantuvieron en el invernadero, 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 a la fertilización y el riego constante que se aplicó al material para evitar la senescencia de las plantas, lo que pudo alterar el periodo de reproducción bianual reportado en la literatura (CORFO, 1982).

Los explantes seleccionados para realizar las introducciones fueron similares en todos los tratamientos, con el fin de evitar una fuente de variación entre los ensayos realizados.

El proceso de oxidación de un explante inicia en el momento en que este es retirado de la planta, debido al estrés que sufre por el corte, y se agrava al ser sometido al proceso de desinfección.

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 provoca que las células se expandan, permitiendo mayor penetración de las soluciones, incrementando el riesgo de oxidación. Estas lesiones provocan estrés en el explante y liberan fenoles al medio que pueden obstruir los canales de absorción de nutrientes, por lo que se remueven antes de inocularlo en el medio de cultivo.

Los tres tratamientos de desinfección mostraron un porcentaje de oxidación relativamente bajo, 10% para A y B y un 3.33% para C. Esta disminución pese al aumento en las concentraciones de los desinfectantes puede deberse a que las plantas madre de frambuesa fueron tratadas en el invernadero con algunos de los productos empleados para el establecimiento *in vitro*, con el fin de disminuir su carga de microorganismos. Las concentraciones de los productos se incrementaron progresivamente, lo que pudo generar una habituación de los explantes a los desinfectantes superficiales, contribuyendo a la poca oxidación que presentaron.

La contaminación por microorganismos es el principal obstáculo al realizar un 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 bomba al vacío y la disminución del pH en el medio de cultivo.

El tratamiento B presentó menor contaminación total al compararlo con el tratamiento A. Esto se debió a la adición de Ferbam® en el tratamiento B.

Entre los tratamientos B y C la diferencia (7%) la constituye la concentración de los desinfectantes, ya que en ambos se emplearon los mismos productos.

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

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. Su toxicidad se basa en la habilidad del anión de acoplar el cobre, la solubilidad moderada de los carbamatos facilita su transporte al sitio susceptible de cobre y también retarda su detoxificación por los metabolitos ácidos del hongo (González, 2000).

El Bisolex® contiene benzimidazoles que son compuestos heterocíclicos del nitrógeno, que actúan como fungicidas sistémicos de sitio específico, que bloquean la mitosis, formando un enlace benzimidazol-tubulina en los organismos fungosos. 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 esta puede ocurrir por sobre exposición. Esta puede ser una posibilidad para el aumento en la sobrevivencia de los hongos a los tratamientos de desinfección B y C, para los cuales las plantas en invernadero ya habían sido tratadas por meses con estos fungidas.

Las plántulas que sobrevivieron se mostraron saludables y vigorosas, su desarrollo fue similar en los tres tratamientos (Figura 12).

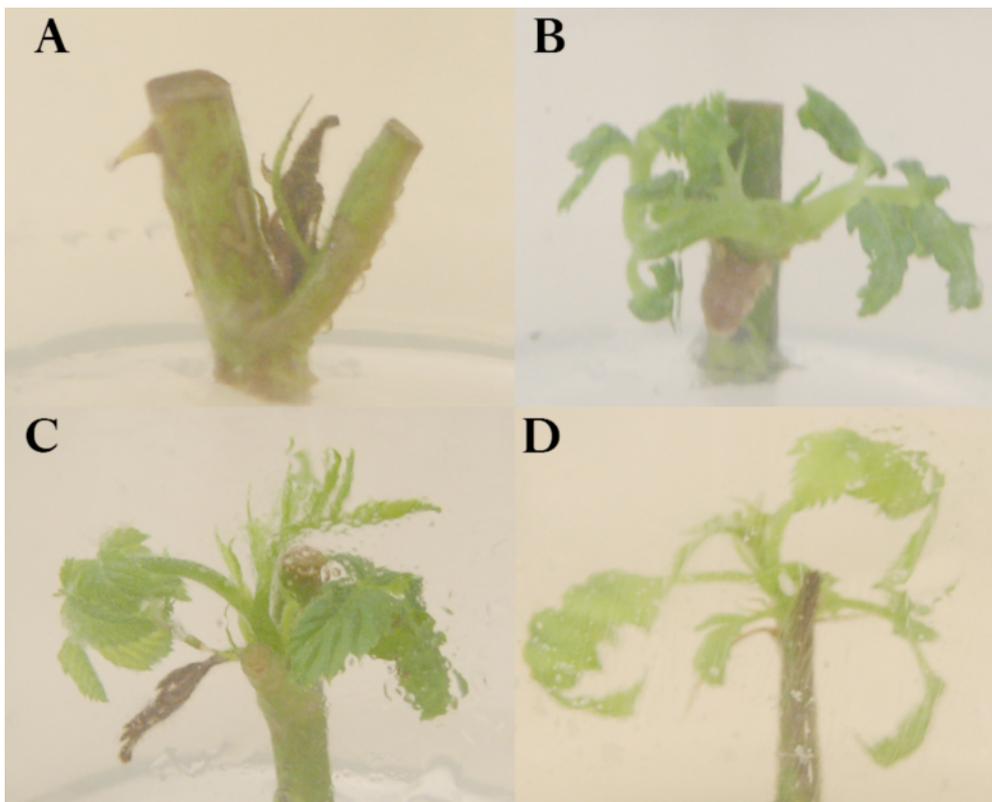


Figura 12. Explantes en diferentes etapas de crecimiento A) etapa inicial, B) 1 semana, C) 2 semanas, D) 3 semanas, después de la introducción.

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

Ensayo de Micropropagación

A pesar de que los promedios para las tres variables fueron similares para ambos sistemas, el sistema de inmersión temporal mostró un promedio de longitud por explante (2.15cm) mayor al medio semisólido (1.90cm). Además las vitroplantas obtenidas de las RITA[®]s fueron más vigorosas y mostraron mayor cantidad de hojas y extensión de área foliar.

Rubus spp se ha adaptado con éxito a la micropropagación en medio semisólido en presencia de citocininas (González *et al*, 2000). Sin embargo con el uso de 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 la brotación 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 importantes de oxidación, y su desarrollo fue muy 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 brotación 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 responsable de toxicidades en las vitroplantas.

La densidad de siembra por RITA® es otro factor a 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 a este respecto. El tamaño alcanzado por las hojas y los ejes sugiere que una densidad muy alta podría causar problemas de autosombreo graves entre las vitroplantas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, ninguno de los sistemas presenta una clara superioridad para la micropropagación, sin embargo la mayor vigorosidad de las plántulas en el sistema de inmersión temporal, puede ser una ventaja durante el proceso de aclimatación de las plántulas. Es recomendable, sin embargo, realizar pruebas adicionales empleando el sistema de inmersión temporal, con el fin de optimizar la técnica.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- El tratamiento de desinfección C, 6g/l Agri-mycin® & Bisolex® y 5g/l Ferbam® 60min, CaClO₂ 3,5% 15min en bomba al vacío, fue el más apropiado para la introducción de miniestacas de frambuesa.
- El medio de cultivo un M&S completo suplementado con 1,5mg/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.
- Un buen manejo agronómico del material en invernadero disminuye la carga de microorganismo y la oxidación del material durante el proceso de desinfección.
- El medio de multiplicación M&S completo suplementado con 2mg/l de 6-bencilaminopurina (BAP), 1mg/l de ácido giberélico (AG₃), 100mg/l de ácido ascórbico, 30g/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 empleando el sistema de inmersión temporal podría presentar ventajas en la etapa de aclimatación al ser más vigorosas.

Recomendaciones

- Utilizar explantes con yemas bien desarrolladas, preferiblemente en forma de Y-.
- Las plántulas para micropropagación deben poseer un mínimo de dos hojas desarrolladas y una altura de 10mm.
- Es importante investigar la densidad de siembra por RITA® para optimizar el sistema de inmersión temporal y reducir al mínimo los problemas causados por la competencia entre las plántulas y el sombreado.
- Se deben realizar estudios adicionales empleando la técnica de inmersión temporal con el fin de incrementar el número de brotes obtenidos por plántula y así lograr estandarizar el procedimiento.

BIBLIOGRAFÍA

Albarran, J., Bertrand, B., Lartaud, M., Etienne, H. 2004. "Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica* L.) somatic embryos". Plant Cell, Tissue and Organ Culture 00: 1-10.

Almeida, J., Contreras, I. 2004. "Propagación in vitro de Mora de Castilla (*Rubus glaucus*) a partir de miniestacas". Ecofisiología y Fisiología Vegetal. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela. Disponible en: <<http://www.botanica-alb.org/publicaciones/Otros/5 EcolFis.pdf>> (14/06/05)

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/jbs1111106-1111.pdf>> (14/06/05)

Auccasi, M. 2005. "Principios de desinfección y esterilización". Disponible en: <http://www.enfermeria_peru.com/mistrabajos/prindesinfeccion.htm> Lima, Perú. (07/06/05)

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)

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. 32p.

Daquinta, M., Lezcano, Y., Escalona M., Santos., R. 2001. *“Multiplicación in vitro del banano FHIA-18 con el empleo de paclobutrazol”* INFOMUSA: 10: 2: 22-24

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 potencial”*. *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> (13/06/05)

Escalona M., Lorenzo J., González B., González, J., Daquinta, M., Borroto, C., Blanco, M., Espinosa, P., Fundora, Z., Cid, M., Lezcano, Y., Melo J. 1998. *“Los biorreactores de inmersión temporal: una tecnología eficiente en la obtención de semilla de alta calidad”*. Centro de Bioplasmas de Ciego de Avila. Cuba. Disponible en: <http://www.cuba.cu/ciencia/acc/agrarias1998_resumen.htm> (13/06/05)

Etienne, H., Berthouly, M. 2002. *“Temporary immersion systems in plant propagation”*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*: 3: 69: 215-231.

Etienne, H., Solano, W., Pereira, A., Etienne, D.B., Berthouly M., Bertrand, B., Anthony, F., Cote, F. 1997. *“La propagación masal de los híbridos F1 de cafés arábigos”*. Boletín-Promecafe, No 80,11-15.

Flores, D., Argüello, F. 2005. "*Cultivo de la Mora Innovaciones Tecnológicas*". Primera Edición. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Cartago.176p.

Fontúrbel, F. 2002. "*Micropropagación de un cultivo perenne*". Biología y Ciencias de la Salud: 7. Disponible en: <<http://www.biologia.org/?pid=5001&id=47>> (14/06/05)

Gonzalez, 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,No 1.73pp. Disponible en: <<http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1744-7348.2000.tb00059.x>> (14/06/05)

Infoaserca. 2004. "*El mercado mundial de la frambuesa y la zarzamora*". Profaex, México. Disponible en: <www.infoaserca.gob.mx/proafex/FRAMBUESA_Y_ZARZA.pdf> (07/05/04)

Kyte, L. & J. Kleyn. 1996. "*Plants from test tubes: An introduction to Micropropagation*". Tercera Edición. Editorial Timber Press EUA.

Kozai,T.,Jeong,B.,Kubota,C., Murai. "*Effects of volume and inicial strenght of médium on the growth, photosynthesis and ion uptake of potato (Solanum tuberosum L.) plantlet in vitro*". Journal of the Japanese Society of Horticultural Science 64:63-71.

Mendel, F. 1989. "*Propagación y Plantación de Frambuesos y Espárragos*". Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 33p.

Murashige, T., Skoog, G. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". *Physiol.Plant* 15: 473-497.

Navarro, W., Perea, M. 1995. "Técnica *in vitro* para producción y mejoramiento de las plantas". Segunda Edición. Editorial de la Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica. 105p.

PROEXANT (Promoción de Exportaciones Agrícolas No Tradicionales). 2004. "Frambuesa". Disponible en: <<http://www.proexant.org.ec/Manual%20de%20Frambuesa.htm>> Quito, Ecuador. (19/05/04)

Quiroga, J. 2005. "Con Biotecnología Vegetal Aceleran la Reproducción de Plantas". Archivo de Noticias de FUCOA. Ministerio de Agricultura de Chile. Disponible en:<http://www.fucoa.gob.cl/pdf_zip/noticias/105_05.html> (13/06/05)

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

Soberón J., Quiroga E., Sampietro A., Vattuone M. 2005. "Citocininas".Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán. Argentina. Diponible en: <http://www.biologia.edu.ar/plantas/reguladores_vegetales_2005/Citocinas.htm> (27/04/06)

Soberón J., Quiroga E., Sampietro A., Vattuone M. 2005. "Giberalinas".Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán. Argentina. Diponible en: < http://www.biologia.edu.ar/plantas/reguladores_vegetales_2005/giberelinas.htm> (27/04/06)

Strik, B., Martin, R. 2003. "Impact of Raspberry bushy dwarf virus on 'Marion' blackberry". Plant Dis. 87:294-296. Disponible en: <<http://www.apsnet.org/pd/pdfs/2003/0116-01R.pdf>> (27/04/06)

Teisson, C., Alvard, D. 1994. "A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: temporary inmersión". VIIIth. Congress of Plant Tissue and Cell Culture (ppS2-2) Firenze, Italy. Book of Abstracts. pp25.

Thiem, B. 2003. "Rubus chamaemorus L. - a boreal plant rich in biologically active metabolites: a review". BIOL. LETT. 40(1): 3.13. Disponible en: <http://www.staff.amu.edu.pl/~biollett/biollett_40_1_3_13.pdf> (14/06/05)

Tsao, C., Postman J., Reed B. 2000. "Virus Infections Reduce In vitro Multiplication of 'Malling Landmark' Raspberry". In vitro Cellular and Development Biology - Plant, Vol 36, No 1. pp 65-68.

Xue, H., Aziz, R., Sun, N., Cassady, J., Kamendulis, L., Xu, Y., Stoner, G., Klaunig, J. 2001. "Inhibition of cellular transformation by berry extracts". Carcinogenesis 22: Vol 2: 351-356. Disponible en: <<http://carcin.oxfordjournals.org/cgi/reprint/22/2/351>> (13/05/06)

ANEXOS

Anexo 1. Análisis Estadísticos:

Ensayo de Establecimiento *in vitro*

Tabla 1. Datos para análisis de varianza de los tres tratamientos utilizados.

Tratamiento	Variable	Repeticiones		Media
A	<i>Sobrevivencia</i>	6.00	9.00	7.50
	<i>Oxidación</i>	0.00	6.00	3.00
	<i>Contaminación</i>	24.00	15.00	19.50
B	<i>Sobrevivencia</i>	12.00	8.00	10.00
	<i>Oxidación</i>	0.00	5.00	2.50
	<i>Contaminación</i>	18.00	17.00	17.50
C	<i>Sobrevivencia</i>	15.00	12.00	13.50
	<i>Oxidación</i>	0.00	2.00	1.00
	<i>Contaminación</i>	15.00	15.00	15.00

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

Análisis de Varianza

1. Sobrevivencia

Factor de corrección	640.67
Cuadrados de tratamiento	36.33
Cuadrado medio de los tratamientos	18.17
Suma de cuadrados del total	53.33
Suma de cuadrados del error	14.33
Cuadrado medio del error	0.53
Estadístico de prueba F1	34.22

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado	F5%	F1%
Tratamientos	2	36.33	18.17	34.22	3.39	7.77
Error	27	14.33				
Total	29	50.67				

Criterio de decisión:

F calculado es menor a F5%	no existe diferencia significativa
F calculado se encuentra entre los valores de F5% y F1%	existe diferencia significativa
F calculado es mayor a F1%	existe alta diferencia significativa

Conclusión: Existe alta diferencia significativa entre los tratamientos para la sobrevivencia

Prueba de Tukey

Numero de comparaciones	3	
Error estándar de la media	0.52	
Diferencia mínima significativa	5%	1.80
	1%	2.29

	1.80	2.29
2.50	X	
6.00		X
3.50		X

Criterio de decisión:

valor de la resta de las medias es mayor a DMS 1%	existe alta diferencia significativa
valor de la resta de las medias se encuentra entre los valores de DMS 1% y DMS 5%	existe diferencia significativa
valor de la resta de las medias es menor a DMS 5%	no existe diferencia significativa

Conclusión: Existe alta diferencia significativa entre los tratamientos A y C y B y C y hay mediana diferencia significativa entre A y B.

2. Oxidación

Factor de corrección	28.17
Cuadrados de tratamiento	4.33
Cuadrado medio de los tratamientos	2.17
Suma de cuadrados del total	36.83
Suma de cuadrados del error	4.33
Cuadrado medio del error	0.16
Estadístico de prueba F1	13.50

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado	F5%	F1%
Tratamientos	2	4.33	2.17	13.50	3.39	7.77
Error	27	4.33				
Total	29	8.67				

Criterio de decisión:

F calculado es menor a F5%

no existe diferencia significativa

F calculado se encuentra entre los valores de F5% y F1%

existe diferencia significativa

F calculado es mayor a F1%

existe alta diferencia significativa

Conclusión: Existe alta diferencia significativa entre los tratamientos para la oxidación.

Prueba de Tukey

Numero de comparaciones	3	
Error estándar de la media	0.28	
Diferencia mínima significativa	5%	0.99
	1%	1.26

		0.99	1.26
0.50	X		
2.00			X
1.50			X

Criterio de decisión:

valor de la resta de las medias es mayor a DMS 1%

existe alta diferencia significativa

valor de la resta de las medias se encuentra entre los valores de DMS 1% y DMS 5%

existe diferencia significativa

valor de la resta de las medias es menor a DMS 5%

no existe diferencia significativa

Conclusión: Existe alta diferencia significativa entre los tratamientos A y C y B y C y no hay diferencia significativa entre A y B.

3. Contaminación

Factor de corrección	1802.67
Cuadrados de tratamiento	20.33
Cuadrado medio de los tratamientos	10.17
Suma de cuadrados del total	61.33
Suma de cuadrados del error	24.33
Cuadrado medio del error	0.90
Estadístico de prueba F1	11.28

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado	F5%	F1%
Tratamientos	2	20.33	10.17	11.28	3.39	7.77
Error	27	24.33				
Total	29	44.67				

Criterio de decisión:

F calculado es menor a F5%	no existe diferencia significativa
F calculado se encuentra entre los valores de F5% y F1%	existe diferencia significativa
F calculado es mayor a F1%	existe alta diferencia significativa

Conclusión: Existe alta diferencia significativa entre los tratamientos para la contaminación

Prueba de Tukey

Número de comparaciones	3	
Error estándar de la media	0.67	
Diferencia mínima significativa	5%	2.34
	1%	2.99

		2.34	2.99
2.00	X		
4.50			X
2.50		X	

Criterio de decisión:

valor de la resta de las medias es mayor a DMS 1%	existe alta diferencia significativa
valor de la resta de las medias se encuentra entre los valores de DMS 1% y DMS 5%	existe diferencia significativa
valor de la resta de las medias es menor a DMS 5%	no existe diferencia significativa

Conclusión: Existe alta diferencia significativa entre los tratamientos A y C; Mediana diferencia entre B y C y no hay diferencia significativa entre A y B.

Anexo 2. Análisis Estadísticos:

Ensayo de Micropropagación

Tabla 1. Datos para análisis de varianza de los dos tratamientos utilizados.

Tratamiento	Variable	Repeticiones		Media
	<i>Longitud</i>	1.70	2.10	1.90
A	<i>Brotos</i>	1.50	1.70	1.60
	<i>Nudos</i>	1.90	2.60	2.25
	<i>Longitud</i>	2.10	2.20	2.15
B	<i>Brotos</i>	1.70	1.50	1.60
	<i>Nudos</i>	2.10	2.60	2.35

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

Prueba de Hipótesis para dos Medias

Estadístico de prueba:

$$z = \frac{u_1 - u_2}{\sqrt{[(\sigma_1^2/n_1) + (\sigma_2^2/n_2)]}}$$

Donde:

u_1 = valor promedio del tratamiento en medio semisólido.

σ_1^2 = varianza obtenida del tratamiento en medio semisólido.

n_1 = número de individuos que componen el tratamiento en medio semisólido.

u_2 = valor promedio del tratamiento en medio líquido.

σ_2^2 = varianza obtenida del tratamiento en medio líquido.

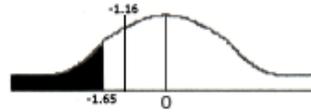
n_2 = número de individuos que componen el tratamiento en medio líquido.

1. Longitud

H_0 : No existe diferencia significativa entre las medias ($x_1 - x_2 = 0$)

H_a : Existe diferencia significativa entre las medias ($x_1 - x_2 < 0$)

$$\begin{aligned}x_1 &= 1.90 & x_2 &= 2.15 \\ \sigma_1^2 &= 0.70 & \sigma_2^2 &= 0.95 \\ n_1 &= 30 & n_2 &= 30 \\ z &= -1.16 \\ z_{\alpha} &= -1.65\end{aligned}$$



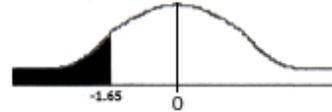
R/ Se acepta H_0 , no existe diferencia entre las medias para la longitud de las plántulas, para una precisión de un 5%.

2. Brotes

H_0 : No existe diferencia significativa entre las medias ($x_1 - x_2 = 0$)

H_a : Existe diferencia significativa entre las medias ($x_1 - x_2 < 0$)

$$\begin{aligned}x_1 &= 1.60 & x_2 &= 1.60 \\ \sigma_1^2 &= 0.65 & \sigma_2^2 &= 0.85 \\ n_1 &= 30 & n_2 &= 30 \\ z &= 0 \\ z_{\alpha} &= -1.65\end{aligned}$$



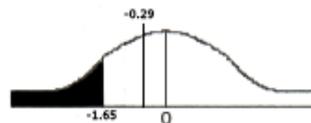
R/ Se acepta H_0 , no existe diferencia entre las medias para el número de brotes por explante, para una precisión de un 5%.

3. Nudos

H_0 : No existe diferencia significativa entre las medias ($x_1 - x_2 = 0$)

H_a : Existe diferencia significativa entre las medias ($x_1 - x_2 < 0$)

$$\begin{aligned}x_1 &= 2.25 & x_2 &= 2.35 \\ \sigma_1^2 &= 1.30 & \sigma_2^2 &= 1.30 \\ n_1 &= 30 & n_2 &= 30 \\ z &= -0.29 \\ z_{\alpha} &= -1.65\end{aligned}$$



R/ Se acepta H_0 , no existe diferencia entre las medias para número de nudos por explante, para una precisión de un 5%.