

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA CITOGÉNICA
DE APLASTADO DE PUNTAS DE RAÍZ “SQUASH”
PARA EL CONTEO DE CROMOSOMAS MITÓTICOS
EN *Rubus glaucus* Benth.**

LINA MARCELA DELGADO GARCÍA

**UNIVERSIDAD DEL QUINDIO
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y TECNOLOGÍAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
ARMENIA, QUINDÍO
2009**

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA CITOGENÉTICA
DE APLASTADO DE PUNTAS DE RAÍZ “SQUASH”
PARA EL CONTEO DE CROMOSOMAS MITÓTICOS
EN *Rubus glaucus* Benth.**

LINA MARCELA DELGADO GARCÍA

**Presentado como pre-requisito para la obtención del título de
Bióloga otorgado por el programa de Biología con énfasis en
biodiversidad de la Universidad del Quindío**

Directora

**Marcela Uribe Lastra M. Sc
Laboratorio de Biotecnología Vegetal U.T.P.**

**UNIVERSIDAD DEL QUINDIO
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y TECNOLOGÍAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
ARMENIA, QUINDÍO
2009**

TABLA DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
GLOSARIO	7
RESUMEN	10
1. INTRODUCCIÓN	12
2. OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GENERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. MARCO TEÓRICO	16
3.1 PLANTA OBJETO DE ESTUDIO	17
3.1.1 TAXONOMÍA	17
3.1.2. ORIGEN	18
3.1.4 DISTRIBUCIÓN DEL GÉNERO <i>Rubus</i>	18
3.1.4 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	20
3.1.5 BIOLOGÍA FLORAL DEL GÉNERO	22
3.1.6 IMPORTANCIA	23
3.1.7 PROPAGACIÓN	25
3.2 CITOGENÉTICA	27
3.3 TÉCNICA DE APLASTADO O “SQUASH”	31
3.4 CITOGENÉTICA DE RUBUS	32
4. ANTECEDENTES	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS	37
5.1 ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS CITOGENÉTICAS	37
5.1.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	38

5.1.1.1 Semilla	38
5.1.1.2 Estacas y acodos	39
5.1.1.3 Cultivo <i>In Vitro</i>	
5.1.2 DETERMINACIÓN DE LA HORA DE CORTE	39
5.1.3 PREFIJACIÓN O PRETRATAMIENTO	40
5.1.4 FIJACIÓN	40
5.1.5 MACERACIÓN O HIDRÓLISIS	41
5.1.6 TINCIÓN	41
5.1.7 APLASTADO O SQUASH	42
5.1.8 OBSERVACIÓN	42
5.2 ENSAYOS CON YEMAS FOLIARES	42
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
6.1 ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS CITOGENÉTICAS	43
6.1.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	43
6.1.1.1 Semillas	43
6.1.1.2 Estacas y Acodos	44
6.1.1.3 Cultivo <i>In Vitro</i>	45
6.1.2 DETERMINACIÓN DE LA HORA DE CORTE	47
6.1.3 PRETRATAMIENTO O PREFIJACIÓN	48
6.1.4 FIJACIÓN	49
6.1.5 HIDRÓLISIS	50
6.1.6 TINCIÓN	51
6.1.7 OBSERVACION DE CROMOSOMAS	51
6.2 ENSAYOS CON YEMAS FOLIARES	53
7. CONCLUSIONES	55
8. RECOMENDACIONES	57
9. BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Algunos problemas fitosanitarios del cultivo de la mora de castilla	22
Tabla 2. Lugares de procedencia de las plantas de <i>Rubus glaucus</i> utilizadas en este estudio.	37
Tabla 3. Ensayos de pretratamiento con tres tipos de inhibidores en diferentes tiempos de exposición.	40
Tabla 4. Ensayos de fijación con Farmer a diferentes temperaturas y tiempos de exposición.	41
Tabla 5. Obtención de raíces en cada uno de los métodos de propagación utilizados.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Fig. 1 <i>Rubus glaucus</i> Benth.	18
Fig. 2 A Flores y B. Frutos de <i>Rubus glaucus</i> Benth.	27
Fig. 3 Métodos de propagación utilizados para la obtención de ápices radiculares A. Semillas B. Estacas C. Acodos D. Estacas con Enraizador E. Cultivo In vitro F. Plántulas en bolsa.	47
Fig. 4 Numero de células en mitosis (por campo microscópico 100X) a diferentes horas del día.	48
Fig. 5 Cromosomas somáticos de <i>R. glaucus</i> con 4n (28).	53
Fig. 6 Otras Fases de la Mitosis en <i>R. glaucus</i> . A. Interfase. B. Telofase. C. Anafase.	53

GLOSARIO

Anafase: Etapa de la división celular en eucariontes en la cual los cromosomas previamente duplicados migran a diferentes polos de la célula.

Autosomas: Cromosomas diferentes a los cromosomas sexuales. En seres humanos existen 22 pares de autosomas.

Cariotipo: Complemento cromosómico de una célula. Se realiza con cromosomas metafásicos, los que se ordenan en parejas de cromosomas homólogos de acuerdo básicamente a sus longitudes y posición del centrómero

Centrómero: Región especializada del cromosoma eucarionte nuclear al cual las fibras del huso se unen durante la división celular. La ubicación del centrómero en el cromosoma determina si un cromosoma es telocéntrico (centrómero en extremo), acrocéntrico (centrómero cercano a extremo), submetacéntrico (centrómero cercano a posición media) ó metacéntrico (centrómero en posición media).

Citogenética: Estudio de la herencia mediante la aplicación de técnicas citológicas y genéticas.

Colchicina: Compuesto alcaloide que inhibe la formación del huso mitótico durante la división celular. Se utiliza para la obtención de cariotipos.

Cromátidas: Son los cromosomas resultantes de la replicación de una molécula de DNA eucarionte en la fase S del ciclo celular, donde se replica

todo el DNA menos el DNA centromérico. Así, las moléculas hijas ó cromatidas permanecen unidas a través del centrómero. Un cromosoma aparece formado por dos cromátidas.

Cromatina: Complejo de DNA, proteínas histonas, proteínas no histonas y RNA presentes en el núcleo celular.

Cromosoma: Corresponde a una molécula de DNA acompañada con proteínas y RNA. Los cromosomas eucariontes son lineales y poseen centrómero y generalmente se presentan en pares. El cromosoma procarionte es circular, no posee centrómero y el genoma es monoploide.

Cromosoma Acéntrico: Cromosoma ó fragmento de cromosoma sin centrómero y se pierde en la división celular.

Cromosoma Acrocéntrico: Cromosoma con centrómero localizado muy cercano al extremo. Los cromosomas humanos 13,14,15,21 y 22 son acrocéntricos.

Cromosoma Dicéntrico : Cromosoma con dos centrómeros.

Cromosomas Metacéntricos: Cromosomas con centrómero en posición media.

Cromosoma Telocéntrico: Cromosoma en el cual el centrómero está localizado en su extremo.

Diploidía: Condición en que cada cromosoma existe en pares. Así cada cromosoma presenta un homólogo. Los cromosomas homólogos presentan igual longitud, posición de centrómero y secuencia de genes

Eucromatina: Cromatina ó regiones cromosomales que se tiñen débilmente y se encuentran relativamente desespiralizadas durante la interfase del ciclo celular, pero se condensan durante la mitosis.

Haploide: Número de cromosomas presentes en los gametos. Se simboliza como n para individuos $2n$ y por ejemplo para la cebada $n=7$. Para individuos $4n$ su número haploide es $2n$.

Haplotipo: Conjunto de alelos de loci estrechamente ligados y que generalmente se heredan como una unidad.

Heterocromatina: Cromatina condensada que se tiñe en núcleos interfásicos, de replicación tardía. Se postula que no posee genes estructurales.

Mapa Físico: Representación ordenada de los genes en un cromosoma basado en unidades físicas (pares de bases de DNA) más que en recombinación.

Mitosis: Corresponde a la separación de los cromosomas previamente duplicados en la fase S del ciclo celular. Cada célula hija recibe la misma cantidad y calidad de material genético.

Ploidía: Se refiere al número de series de cromosomas. Ej. Diploidía: dos series de cromosomas ó $2n$; Triploidía: tres series de cromosomas ó $3n$

Poliploidía: Condición en la cual una célula u organismo posee una serie adicional de cromosomas.

Triploidía: Se refiere a la existencia de tres conjuntos de cromosomas. La célula por lo tanto es $3n$.

RESUMEN

*La mora de castilla **Rubus glaucus**, es tal vez uno de las frutales mas apetecidos en el mercado, su alto contenido de vitaminas y minerales y su diversidad de usos la han convertido en uno de los cultivos promisorios de la región. A pesar de que la especie ha sido foco de muchas investigaciones encaminadas a su propagación, existe un vacío en la información citogenética que contribuya a su caracterización. Con esta investigación se logró la estandarización de la técnica de aplastado de raíces o “squash” para el conteo de cromosomas en células somáticas; se utilizaron raíces provenientes de plántulas establecidas en vivero. En la fase de pretratamiento se utilizó 8-Hidroxiquinolina por 4 horas a temperatura ambiente, se fijó con la solución de Farmer por 24 horas a 5°C; se realizaron dos tipos de hidrólisis: ácida (HCl 1N* 10min a 60°C) y enzimática (pectinasa 0.1%, celulasa 0.2%, macerozima 0.2%* 30min a 37°C) y la tinción se llevo a cabo con Acetocarmín. El número de cromosomas encontrado para R. glaucus fue de 28 cromosomas (tetraploide), sin hallar diferencias con respecto a las distintas procedencias cultivadas en el Eje Cafetero.*

Palabras claves: Conteo de cromosomas, “Squash”, ploidía, *Rubus glaucus*.

ABSTRACT

Rubus glaucus is, perhaps, one of the most desirable fruits in the market. Its high content of vitamins and minerals and their diversity of uses has become one of the promising crops of the region. Although the specie has been the focus of many investigations aimed at the spread, there is a gap in information that contributes to their cytogenetic characterization. This research was focused on the standardization of the technique of crushed roots or "squash" for the counting of chromosomes in somatic cells, were used from roots of seedlings in nursery. For a pre-treatment, it was used 8-Hydroxyquinoline during 4 hours at room temperature. The solution was fixed with Farmer for 24 hours at 5 °C. There were two types of hydrolysis: an acidic hydrolysis (HCl 1N * 10min 60 ° C) and an enzymatic hydrolysis (0.1% pectinase, cellulase 0.2%, 0.2% macerozima * 30min at 37 ° C). The Staining was carried out with Acetocarmín. The number of chromosomes found in *Rubus glaucus* was 28 chromosomes (tetraploidy). There were not found differences between singular sources grown in the coffee belt.

Keywords: Counting of chromosomes, "Squash", ploidy, *Rubus glaucus*.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha sido notable el auge que han adquirido los frutales de clima frío moderado (mora, lulo, tomate de árbol, uchuva, aguacate, curuba, granadilla, brevo y caducifolios, entre otros), evidenciado principalmente en el aumento de las áreas destinadas a su siembra, así como se ha acrecentado el interés por su cultivo y mejoramiento.

Uno de los frutales con mayor aceptación en el mercado ha sido la mora de castilla o *Rubus glaucus* Benth, perteneciente al género *Rubus* (*Rosaceae*), que por su sabor y su diversidad de usos ha adquirido gran importancia en este campo (Hernández *et al.*, 2001). Esta especie sobresale entre las cultivadas por la variabilidad en tamaño, color y calidad del fruto; (Erazo, 1983) de este modo, puede tener numerosos usos como fruta en fresco, jugos, mermeladas, postres y vinos; convirtiéndose no sólo en uno de los frutales más promisorios del país, si no también en una especie de gran interés para su mejoramiento.

Sin embargo, recientemente estas plantaciones se han visto expuestas a un sinnúmero de ataques de plagas y enfermedades (hongos, virus, bacterias), que ocasionan un grave deterioro en la productividad de la planta y en consecuencia, afectan la economía de los cultivadores de mora en los departamentos del Eje Cafetero (Aguilar, 2006).

Para la solución de esta problemática se han empleado muchas estrategias que de una forma u otra han resultado ser eficientes a diferentes niveles, pero ha sido la inclusión de las nuevas tecnologías a través del *mejoramiento genético*, quizá una de las mejores herramientas, ya que es posible hacer

selección de los caracteres deseados o favorables para las especies y llegar a la creación de plantas resistentes a partir de la variedad existente.

Es importante, entonces tener en cuenta que cuando se hace mejoramiento genético en una especie es fundamental conocer e identificar las características que muestra cada material; ya que se pueden encontrar muchas barreras limitantes para la obtención de los objetivos. El nivel de ploidía por ejemplo, es una de ellas, Poehlman y Allen (2003) mencionan que el cruzar progenitores con diferentes niveles de ploidía, puede dar como resultado progenies estériles o genéticamente inestables.

Es por esto que se hace necesario revisar la citogenética de la mora de castilla o *Rubus glaucus* Benth en esta región, para contribuir al planeamiento de estrategias que permitan solucionar algunos de los problemas fitosanitarios a los que se ven expuestos los cultivos de mora.

Y es que a pesar de ser el foco de muchas investigaciones orientadas a su mejoramiento, la información acerca de las caracterizaciones genéticas o citogenéticas en esta especie es muy escasa, por no decir nula, impidiendo así el desarrollo de nuevas herramientas de gran utilidad en la determinación del potencial de cruzamiento entre genotipos compatibles (Mora, *et.al.*, 2005).

El número básico encontrado en el género *Rubus* es universalmente 7 y, actualmente los niveles de ploidía se conoce oscilan desde 2x hasta 14x y posiblemente 18x. Los primeros estudios demostraron que la poliploidía ha jugado un papel importante en la evolución de este género. (Thompson, 1997). En Colombia y en especial en la zona Cafetera, que puede ser considerada epicentro de diversidad para este grupo, se carece de información al respecto, por lo que resulta indispensable comenzar a evaluar

esta información; que puede ser un aporte valioso a la caracterización de este germoplasma y que además puede favorecer la producción de conocimiento en torno al mejoramiento genético.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Estandarizar la técnica citogenética de aplastado de puntas de raíz “squash” para el conteo de cromosomas mitóticos en *Rubus glaucus* Benth.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la hora mitótica apropiada para el conteo de cromosomas en *Rubus glaucus* Benth.

Establecer los diferentes parámetros en las fases de pretratamiento, fijación, hidrólisis, tinción y observación, utilizados en la técnica de aplastado de puntas de raíz “squash”.

Realizar una comparación en el número de cromosomas en diferentes procedencias de *Rubus glaucus* Benth, cultivadas en el Eje Cafetero.

3. MARCO TEÓRICO

Rubus es un grande e importante género de la familia Rosaceae que incluye un estimado de 800 a 1000 especies (Thompson, 1995a; Thompson, 1997; Alice, Campbell, 1999, Hummer, 1996) altamente distribuidas por todo el mundo, las especies son encontradas en todos los continentes excepto en la antártica, desde las tierras bajas en los trópicos hasta las regiones subárticas. (Thompson, 1995a).

El número exacto de especies es desconocido ya que un amplio tratamiento taxonómico del género no ha sido realizado desde Focke (1910, 1911, 1914). Desde eso muchas nuevas especies han sido descritas y muchos estudios se han llevado a cabo sobre floras locales, clarificando especies y sinonimias. (Thompson, 1995a). Un estudio taxonómico más detallado de este género es necesario para terminar con más precisión el número de especies. (Thompson, 1997).

Además es considerado uno de los géneros más cambiantes taxonómicamente de las plantas con flores y la circunscripción de especies es complicada por procesos de hibridización, poliploidía, agamospermia y carencia de un concepto universal de especie. (Alice, Campbell. 1999).

Rubus exhibe una gran diversidad morfológica incluyendo especies erectas, largas y leñosas; delicadas, semiherbáceas, postradas; y trepadoras con hojas altamente reducidas. (Alice, Campbell. 1999; Hall, 1990).

Este género es económica y ecológicamente importante como fruto de cultivo, ornamental, como hierba invasiva, y en sucesiones boscosas tempranas. Muchas especies proveen una fuente importante de alimento, desde producción comercial de fresas y moras así como también desde frutos recogidos de plantas silvestres. (Thompson, 1995a).

3.1 PLANTA OBJETO DE ESTUDIO

3.1.1 TAXONOMÍA

La especie *Rubus glaucus* Benth, presenta la siguiente ubicación taxonómica según la red de información sobre recursos de germoplasma (GRIN del inglés “Germplasm Resources Information Network”) del departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA del inglés “United States Department of Agriculture”):

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Rosales
Familia: Rosaceae
Subfamilia: Rosoideae
Tribu: Rubeae
Género: Rubus
Subgénero: Idaeobatus
Especie: *Rubus glaucus* Benth.

NOMBRES COMUNES

- Andean blackberry
- mûre des Andes (French)
- Andenbeere (German)
- Andenhimbeere (Source: Dict Rehm) [German]
- Mora (Spanish)
- Mora de Castilla (Spanish)
- Zarzamora azul (Spanish)



Fig. 1 *Rubus glaucus* Benth. **1A:** FUENTE www.hawkswickfruit.co.uk/photos.html.
1B: FUENTE: <http://pictorica.wordpress.com/2006/09>.

3.1.2. ORIGEN

La Mora de Castilla *Rubus glaucus* fue descubierta por Hartw y descrita por Benth, llamada Rubus, en latín rojo y glaucus que en latín significa blanquecina, debido al color del envés de sus hojas; es originaria de las zonas altas tropicales de América principalmente en Colombia, Ecuador, Panamá, Guatemala, Honduras, México y Salvador (Franco, *et al.* 1996).

Es un anfiploide fértil que combina las características de las moras del subgénero *Idaeobatus* y de las moras del subgénero *Rubus* (Jennings, 1998) (citado por Marulanda y Márquez, 2001).

3.1.3 DISTRIBUCIÓN DEL GÉNERO *Rubus*

Las poblaciones de *Rubus*, se presentan dispersas en el paisaje agrícola, formando parte del borde de matorrales y pequeños fragmentos de bosque andino o pajonales y matorrales de páramo; también en hábitat de origen

antrópico, como cercas de piedra, o cercas de alambre que sirven de percha para aves dispersoras y generadoras de clones fundadores en los linderos de pastizales (Rivera *et al.*, 1997).

Rubus ha sido dividido en 12 subgéneros de los cuales solo pocas especies han sido domesticadas, el subgénero *Idaeobatus* contiene las “frambuesas” que están distribuidas en el hemisferio Norte, principalmente Asia, África y Norteamérica; el subgénero *Rubus* incluye especies encontradas en Europa, Asia y NorteAmérica, mientras que el subgénero *Orobatus* es exclusivo de SurAmérica (Ballington, *et al* 1993).

Especies representativas del subgénero *Rubus*, *Orobatus* e *Idaeobatus* son encontrados en los Andes colombianos y ecuatorianos, distribuidos de la siguiente manera:

- Subgenero *Rubus*: *R. adenothallus*, *R. bogotensis*, *R. robustus* , *R. urticifolius*.
- Subgénero *Orobatus* *R. acanthopyllus*, *R. coriaceus*, *R. glabratus*, *R. macrocarpus*, *R. roseus*.
- Subgénero *Idaeobatus*: *R. Ellipticus*, *R. niveus*, *R. glaucus* (Ballington, *et al* 1993).

Romoleroux (1992) reporta la existencia de nueve especies comestibles en Colombia de las 44 especies reportadas. Este mismo autor sostiene que en las regiones de Colombia se encuentra la “mora andina, mora de castilla o zarzamora azul”, incluso afirma que debido al *cruzamiento* natural se pueden identificar hasta 500 variedades del género *Rubus*.

Para la región cafetera, Vargas (2002) reporta seis especies: *R. bogotensis*, *R. glaucus*, *R. macrocarpus*, *R. nubigenus*, *R. porphyromallus*, y *R. urticifolius*, sin embargo Aguilar (2006) en su trabajo de caracterización

molecular del género para el Eje Cafetero reporta siete especies diferentes entre silvestres y cultivadas: *R. glaucus*, *R. megalococcus*, *R. urticifolius*, *R. robustus*, *R. adenotrichos*, *R. rosifolius* y *R. bogotensis*.

De estas especies, *Rubus glaucus* es quizá la única especie del género que es comúnmente cultivada y que se usa comercialmente por sus frutos para ser vendidos en el mercado, ya que las otras se encuentran con más frecuencia en estado silvestre; es decir, en estado natural y por lo tanto producen frutos más pequeños, más ácidos y con menos jugo. (Oliveros, 2000).

3.1.4 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Es una planta perenne de porte arbustivo semierecto hasta 1.5 metros de alto, tallos teretes, rastreros o semierguidos que forman macollas, espinosos, que pueden crecer hasta tres metros, ejes glaucos y glabros; con aguijones amarillos grandes. De longitud variable, ramificados, pueden tener o no aguijones, emiten constantemente brotes en la base (Rivera *et al.*, 1997).

Raíces:

Las raíces se distribuyen en los primeros 30 cm del suelo y tienen disposición horizontal. Su longitud varía entre 0.5 a 1.2 metros. Estas raíces cumplen función de sostén y permiten la propagación de la planta al presentar yemas vegetativas capaces de activarse produciendo brotes (Rivera *et al.*, 1997). A lo largo de las raíces primarias se desarrollan raíces secundarias y terciarias con función de absorción de agua y nutrientes (Franco *et al.*, 1996).

Hojas:

Posee hojas alternas, compuestas, trifoliadas, estípulas basipeciolares, glabras; peciolo 3.8-8 cm de largo, folíolos ovado-lanceolado, largo-

acuminados, 6-9 cm de largo, 2.5-3.5 cm de ancho, márgenes cerradas, glabras por el haz, blanco-tomentosas por el envés (Rivera *et al.*, 1997).

La planta de mora produce diferentes tipos de ramas como: ramas látigo, ramas machos y ramas productivas o hembras (Franco *et al.*, 1996)

Los peciolo también tienen espinas, de color blanco y son de forma cilíndrica, tanto los tallos como las hojas están cubiertas por un polvo blanquecino; pedicelos largos, más o menos aculeados con pelos granulosos rojos, espaciados, brácteas ovado-lanceoladas, enteras u ovadas en el ápice, lóbulos ovado-triangular, abruptamente acuminados (Rivera *et al.*, 1997).

Flores:

Las inflorescencias se presentan en racimos terminales aunque en ocasiones se ubican en las axilas de las hojas terminales, de tipo racimoso-paniculadas. Las flores son blancas de 2 a 2.5 cm de diámetro, filamentos blancos, hasta 3 mm de largo, estilos hasta 4mm de largo, blancos, ovarios densamente tomentosos, frutos hasta 2.6 cm de largo (Rivera *et al.*, 1997). Son hermafroditas y actinomorfas. La flor terminal de la inflorescencia es generalmente de mayor tamaño, la que se fecunda primero y desarrolla frutos más temprano. (Franco *et al.*, 1996)

Fruto:

El fruto es un agregado y está formado por muchas drupeolas y dentro de cada drupeola hay una semilla, los frutos pueden ser de tamaño grande, mediano, o pequeño; maduran de forma dispereja porque la floración no es homogénea. Cuando madura su color va de rojo a púrpura o de rojo a rojo oscuro. El peso del fruto va de 3.0 a 5.0 gramos, es de consistencia dura y sabor agrídulce, su pulpa es rojiza y allí se encuentran las semillas (de 100 a 120). (Franco y Giraldo, 2002).

Semilla:

Es de forma ligeramente cuneiforme, superficie reticulada y tamaño variable, en general mide 5 mm de largo y 2 mm de ancho; su germinación es lenta debido a la dureza e impermeabilidad del endocarpo (Franco et al, 1996).



Fig 2. A. Flores y **B.** Frutos de *Rubus glaucus* Benth. (FUENTE: [http:// www.sxc.hu/photo/705451](http://www.sxc.hu/photo/705451))

3.1.5 BIOLOGÍA FLORAL DEL GÉNERO

El número de flores por inflorescencia varía de acuerdo con la variedad o especie de mora. Algunas variedades producen flores solitarias, pero otras producen grupos que van desde 3 hasta 75 flores. En los cultivares más modernos se ha inducido la producción de flores autógamas, pero naturalmente se presentan plantas con flores que son autoestériles y en la mayoría de las formas silvestres ocurre alogamia (Moore y Skirvin, 1990).

Las flores poseen cinco sépalos permanentes y cinco pétalos blancos, posee de 50 a 100 estambres y alrededor de un número semejante de pistilos, según estudios de Santana *et al.* (2000), para condiciones de CORPOICA

“La Selva” el número de pistilos es de 173.6 en promedio (150 flores) y 65.8 estambres promedio (150 flores); cada pistilo o carpelo tiene un ovario que da origen a un fruto pequeño y carnoso llamado drupa. Entre androceo y gineceo, el néctar es secretado en abundancia (Moore y Skirvin, 1990).

No obstante, Santana y Echeverry (2000), concluyen que la Mora de Castilla requiere de la polinización entomófila para producir más y mejores frutos. Estos resultados se obtuvieron en el municipio de El Retiro (Departamento de Antioquia) a 2300 msnm , y se recomienda a la abeja melífera por su comportamiento y fácil manejo, como un agente ideal para los trabajos de polinización de este cultivo, llegando incluso a doblarse la producción cuando se hacen liberaciones de 2 colonias de abejas por hectárea (Botero, 1994 citado por Zamorano, 2004), aunque también se encontraron insectos de otros órdenes en las flores como: Hemípteros, Dípteros, Coleópteros y Lepidópteros (Zamorano, 2004).

El fruto resulta del desarrollo conjunto de los carpelos y del hipanto, los primeros están llenos de líquido rojo o morado, acidulado y de sabor agradable y contienen semillas diminutas. Los tejidos del hipanto, son más suaves y menos jugosos. Los frutos de *Rubus glaucus* miden de 2 a 3 cm de largo, diámetro 1.5 a 2 cm y de 8 a 10 % de sólidos solubles, similar a la variedad cultivada Evergreen, su perfil varía de circular a elíptico, en otras especies de mora que se cultivan incipientemente en Colombia como *R. macrocarpus*, los frutos pueden alcanzar hasta 6 cm de largo pero no son de muy buena calidad (León, 1987).

3.1.6 IMPORTANCIA

El consumo de moras como frutas frescas o conservas ha sido popular por siglos, la semilla de la mora ha sido encontrada en sitios de edades neolíticas

y de bronce, además de ser mencionada en algunos escritos griegos y romanos indicando el consumo de ese fruto en ese tiempo.

A pesar del continuo uso de frutos de mora a través de los siglos, estos fueron adoptados para cultivos comercialmente o en los jardines de las casa solo hace algunos 150 o 200 años (Hall, 1990).

La mora se ha cultivado casi exclusivamente por su fruto, aunque históricamente algunas partes de las plantas fueron usadas para la producción de tintes, como forraje para el gusano de seda y en la industria farmacéutica (Hall, 1990).

La mora de Castilla es la única especie reconocida como variedad cultivable por el ICA, es importante porque su fruto comestible contiene sustancias nutritivas para la dieta alimenticia; es rico especialmente en Vitamina C, vitamina del complejo B, hierro, calcio y fósforo.

Se usa para fabricar dulces, jaleas, helados, mermeladas y otros alimentos de consumo diario. Como producto congelado es uno de los frutos más exquisitos para la exportación. En nuestro medio generalmente se consume como fruta fresca, el consumo de esta evita las irritaciones de las encías y de la piel, lo mismo que las gripes. (Jaimes, Morales, 1993)

Las moras son actualmente promovidas por ser una rica fuente de polifenoles, compuestos de interés por su actividad antioxidante como neutralizadores o removedores de radicales y posibles beneficios en la salud humana, reduciendo el riesgo de cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras patologías (Mertz, et.al. 2007).

El mayor compuesto fenólico en este grupo son los taninos hidrolizables, antocianinas, ácidos hidroxycinamicos, flavonoides, entre otros (Mertz, et.al. 2007).

La producción de Mora se encuentra dispersa por 15 departamentos, pero Cundinamarca concentra el 32% del total. Aunque existen 44 variedades de plantas rosáceas entre las que encontramos a la mora, esta sólo tiene dos variedades cultivadas en Colombia: la mora de Castilla y la mora Pajarita. La demanda de Mora para la agroindustria ha crecido considerablemente en los últimos años, debido a un auge en el consumo de jugo; sin embargo, persisten dificultades en la producción, tales como el control de plagas y enfermedades, sobre todo en su especie más común en Colombia (la de Castilla) y por las pérdidas debidas al bajo desarrollo en su exigente manejo de postcosecha (Gómez *et al.*, 2006).

3.1.7 PROPAGACIÓN

Aunque la mora se puede propagar sexual o asexualmente, el método recomendado es el asexual. Esto se debe a la baja cantidad de semillas fértiles en cada fruto, el largo período de la germinación y el lento desarrollo de las plántulas que logran germinar.

Los métodos asexuales que se utilizan son el acodo y la estaca. En ambos casos es importante escoger plantas sanas, vigorosas y productivas para obtener el material. Las ramas más apropiadas para propagación son las productivas, sin embargo muchos agricultores utilizan los “fuetes” con el fin de no sacrificar ramas productivas de su plantación (Federación Nacional de Cafeteros, 1999).

Acodo: es el mejor método para obtener plantas vigorosas y de buena raíz, consiste en el enraizamiento de una zona del tallo mientras la rama continua adherida a la planta madre.

Acodo rastrero: se escogen tallos vigorosos, jóvenes y largos que todavía conserven un tono blancuzco. La rama se lleva al suelo formando arco y cada 30 cm se cubre con tierra de tal manera que quede firme; la punta queda sobresaliente; si se mantiene buena humedad y limpieza en las zonas enterradas, al mes el tallo enraiza lo suficiente y el acodo se separa de la planta madre.

Acodo de punta: este sistema se presenta en forma espontánea en algunos casos, consiste en enterrar la punta de tallos vigorosos y blancuzcos, a 10cms de profundidad, ya sea en bolsas o directamente en el suelo. Al mes, la plántula ya con suficientes raíces se separa de la planta madre y al cabo de un mes esta lista para trasplante (Federación Nacional de Cafeteros, 1999).

Estacas: Consiste en cortar trozos de 25-30cms de tallos vigorosos, del grosor de un lápiz y con un mínimo de 2 yemas, preferiblemente 4, que se ponen a enraizar en el sitio apropiado. Para asegurar el enraizamiento se pueden utilizar hormonas enraizadoras en la parte inferior de la estaca. La siembra se hace en bolsa o tierra buena y bien mezclada, de tal manera que una de las yemas quede bajo tierra. Una práctica consiste en tratar el extremo superior de la estaca con parafina caliente con el fin de evitar deshidrataciones y problemas sanitarios.

La propagación por estacas presenta algunos problemas tales como el rápido brotamiento de las yemas, formándose ramas sin que exista aún un sistema radicular, en tal caso la planta detiene su crecimiento (Federación Nacional de Cafeteros, 1999).

In vitro: Es una excelente técnica que permite obtener una rápida y gran producción de material vegetal seleccionado, consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las

condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener el cultivo libre de contaminación microbiana (Federación Nacional de Cafeteros, 1999).

Tabla N.1 Algunos problemas fitosanitarios del cultivo de la mora de castilla. Tomado de Federación Nacional de Cafeteros, 1999.

PLAGA	DAÑO
Áfidos (<i>Aphis sp.</i>)	Chupadores de savia y transmisores de virus
Arañita roja (<i>Tetranychus sp.</i>)	Chupadores en las hojas; el fruto toma color rojo oxidado, las hojas pálidas y arrugadas.
Mosca y gusano de la fruta (<i>Anastrepha sp.</i>)	El huevo eclosiona y la larva se alimenta dentro de la fruta
Barrenador del tallo (<i>Epialus sp.</i>)	Entra en la base de la planta y barrena el tallo
Perla de la tierra de las raíces (<i>Margarodes sp.</i>)	Destruye las raíces
Pudrición del fruto (<i>Botrytis cinérea</i>)	Pudrición del fruto y quemazón en zonas de las ramas y algunas veces las hojas
Antracnosis (<i>Glomerella cingulata</i>)	Pudrición en ramas y tallos en diferentes estados de desarrollo
Muerte descendente (<i>Gloesporium sp.</i>)	Manchas grises de margen café-morado; debilitamiento de ramas de arriba hacia abajo, apareciendo negras y secas.
Roya (<i>Gymnocoria sp.</i>)	Póstulas color naranja en las hojas
Roseta (<i>Cercospella rubi</i>)	Los renuevos forman rosetas que no permiten la apertura de las flores

3.2 CITOGENÉTICA

La Citogenética nace de la convergencia de dos disciplinas: la Citología y la Genética. Sin embargo, -es bueno enfatizarlo- entre las estructuras

citológicas conocidas, son los cromosomas que ocupan el centro de su atención. Por ello, algunos autores han preferido llamarla Cariología (Spotorno 1985), pero este término ha tenido poca aceptación.

Para la Citogenética, son de suma importancia las denominadas constantes cromosómicas, como son el número de cromosomas presentes en cada célula, y el tamaño o largo relativo así como la morfología de cada uno de ellos. A partir de la década de los 70, se incorpora una nueva constante: el patrón de bandas (diferenciación longitudinal de los cromosomas que es propia de cada par homólogo). Tales constantes, bajo determinados procedimientos, permiten la confección de un cariotipo (forma ordenada de presentar los cromosomas de una célula), que podrá ser atribuible a una célula, a un tejido, a un individuo o a una especie, según sea el caso. (Córdova, Lamas. 1997).

Es también sabido, que el cariotipo y los cromosomas que lo conforman, son los elementos de estudio fundamentales -por ser la base física de los genes- de procesos tales como la herencia, la variación, la mutación y, en consecuencia, la evolución de los organismos. (Córdova, Lamas. 1997).

Los cromosomas fueron observados por Nägeli en 1842, poco después del descubrimiento del núcleo bajo el microscopio *como objeto que aparece en la división celular*. El comportamiento de los cromosomas en la división celular fue descrito por Nägeli 2 años después, y esta observación es ahora aceptada como la primera descripción de la mitosis. Un bosquejo detallado cubriendo el proceso completo de mitosis fue reportado por Flemming en 1882; y el término alemán **Chromosomen (tomado del griego que significa cuerpo coloreado)**, fue ideado por von Waldeyer en 1888 porque los cromosomas podían ser teñidos con colorantes. (Fukui, Nakuyama, 1996).

Una propiedad importante de los cromosomas es el hecho de que casi siempre el número de cromosomas en las células es constante, a nivel de individuo y entre todos los individuos de la misma especie. Esta propiedad es sumamente útil en estudios filogenéticos y en la solución de problemas sistemáticos (citotaxonomía). En las células somáticas se encuentran dos juegos de cromosomas homólogos, cada uno de los cuales proviene de uno de sus progenitores masculino y femenino respectivamente, denominándose a esta condición como diploide. En algunas especies, las células somáticas presentan más de dos juegos de cromosomas, recibiendo el nombre de poliploides. (Valladolid, Blas, et.al. 2004)

La variación en los niveles de ploidía ocurre regularmente durante el desarrollo ontogenético de todas las plantas: la fase gametofítica haploide y la fase esporofítica diploide. El símbolo n es usado para representar el número de cromosomas de la fase gamética (n) o esporica ($2n$), pero no específica si la planta es diploide o poliploide. (Guerra, 2000).

El símbolo x es usado para representar el número base, que es el número haploide presente en la población inicial de un clado o taxón monofilético (revisado por Guerra, 2000; ver también Stace et al., 1993; Stace, 2000). El concepto del número base es a menudo confundido con el número monoploide, porque en muchos grupos la variación en el número de cromosomas esta restringida a una sola serie poliploide.

El concepto del número base fue previamente revisado y fue definido como “uno de los números haploides observado en el taxón que mas parsimoniosamente explique la variabilidad de determinado grupo y muestre una clara relación con el número base de los grupos cercanos más relacionados (Guerra, 2000).

La comprobación de que la mayoría de las especies poseen un número constante de cromosomas viene de hace más de un siglo. Los primeros estudios de cromosomas no son, por supuesto, investigaciones taxonómicas, pero fueron llevadas a cabo con el fin de comprender mejor la función de los cromosomas en embriología, desarrollo, procesos de división celular y ciclos de vida. Sin embargo, la publicación más antigua que se ha logrado encontrar es la lista de Bolkhovskikh & al. (1969), y Strasburger (1882), que reportaron 24 cromosomas somáticos en cuatro especies de *Lilium* (Stace, 2000).

Hoy reportar números de cromosomas está todavía de moda, pero muchas novedades son evidentes; la mejora de las técnicas citológicas por ejemplo ha permitido reducir la frecuencia de conteos anómalos encontrados en la literatura, resultado de identificaciones incorrectas, células o tejidos anormales, inusuales o cultivadas mutantes, etc. (Stace, 2000).

La comunidad sistemática está hoy bien servida por los catálogos de conteos de cromosomas de plantas. Muchos datan de antes de 1950 pero ninguno fue tan completo como el de Bolkhovskikh & al. (1969), que enumera todos los conteos de angiospermas hasta 1967.

Reportes de todas las plantas fueron listados desde 1956 en la serie ***Index to plant chromosome numbers*** (*Índice del número de cromosomas de plantas*), una serie que todavía continúa, ahora bajo los auspicios del Jardín Botánico de Missouri (compilaciones actualmente bianuales) (Stace, 2000).

Para compilar en una lista los número de cromosomas conocidos de cualquier taxón en angiospermas es necesario recurrir a Bolkhovskikh y al. (1969) y a los doce volúmenes (hasta la fecha) del *Index to plant chromosome numbers* (Stace, 2000).

El número de cromosomas ha sido reportado para solo 25% de las angiospermas, además su cobertura es muy irregular y no representativa; las proporciones dicen que mientras se conoce el 100% de la flora de Islandia, 85% de la flora de las Islas Británicas, en las áreas tropicales el conocimiento es del 1%.

Muchas de las especies tienen uno o muy pocos conteos, a menudo antiguos y con dudas, mientras que algunos taxones tienen cientos de conteos bien determinados. En la flora Británica, por ejemplo existen 365 conteos para *Ranunculus ficaria* aún no tienen ninguno para *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) (Stace, 2000).

3.3 TÉCNICA DE APLASTADO O “SQUASH”

Los primeros citólogos desarrollaron métodos basados principalmente en el uso de la parafina y el corte al micrómetro de secciones finas de la punta de la raíz para la observación de cromosomas bajo el microscopio óptico. Esta metodología dio buenos resultados en su tiempo, hasta la aparición de la técnica del aplastado de puntas de raíz conocido como “squash” que consiste en un número de pasos a seguir desde la obtención de raíces, hasta la observación de los cromosomas bajo el microscopio óptico. (Valladolid, *et.al.* 2004)

Un rompimiento en las técnicas de preparación de cromosomas vino con el desarrollo de éste método, por el cual las muestras podían ser fácilmente preparadas, evitando procedimientos de seccionamiento muy laboriosos y consumidores de tiempo y las dificultades inherentes en el método “smear” por algunos materiales pesados. La morfología total de los cromosomas podría así ser observada fácilmente bajo el microscopio sin tener en cuenta el material vegetal, aunque los ápices radiculares se convertían en la fuente más usada para la colecta de células mitóticas (Fukui, Nakuyama, 1996).

Muchas técnicas asociadas, tales como el método de pre tratamiento y el método de amortiguamiento fueron subsecuentemente integrados al método squash. Aunque el método squash es aún ampliamente usado entre citogenetistas de plantas para preparar muestras de cromosomas, se requiere destreza y experiencia para constantemente obtener muestras de cromosomas dispersos sobre un portaobjetos (Fukui, Nakuyama, 1996).

En 1944 Emsweller y Stuart sugirieron la posibilidad de usar maceración enzimática de los tejidos de plantas para preparar muestras de cromosomas. La diferencia más conspicua entre células vegetales y animales recae en el hecho en que las células vegetales tienen paredes celulares compactas, las cuales interfieren con la preparación de buenas muestras (Fukui, Nakuyama, 1996).

3.4 CITOGENETICA DE RUBUS

Los primeros estudios citológicos demostraron que la poliploidía ha jugado un papel en la evolución de este género. El número básico es universalmente 7 y, actualmente los niveles de ploidía conocidos oscilan entre 2x y 14x, y posiblemente 18x (Thompson, 1997).

El ensayo más reciente de números cromosómicos en *Rubus* fue incluido en *Chromosome numbers in Flowering Plants* (Federov, 1969). Desde ese tiempo conteos para muchas mas especies de *Rubus* han sido publicadas en reportes ampliamente dispersos. El conocimiento de los números de los cromosomas de las especies es importante para los botánicos que estudian citotaxonomía, evolución, relaciones filogenéticas y para cultivadores de plantas que utilizan hibridación interespecífica como un procedimiento (Thompson, 1997).

4. ANTECEDENTES

En el mundo son pocos los ensayos citogenéticos realizados en el género *Rubus*, es en Europa sin embargo donde se registra la mayor cantidad de trabajos.

En Colombia y en especial en la Zona cafetera, se carece de información al respecto, por lo que resulta indispensable comenzar a evaluar estos aspectos en el género, para así producir más conocimiento en torno al mejoramiento genético de estas especies.

Longley A. en 1924, con su trabajo citológico en *Rubus* demuestra la naturaleza híbrida de un gran número de especies de este género tan polimórfico, determinando además la existencia de poliploidía en las especies más variables del género.

En 1951 Einset J., reporta el número de cromosomas para 27 especies de Bailey Hortorium del New York State College de Agricultura, de la Universidad de Cornell en Ithaca. Las especies incluidas dentro del estudio son miembros del subgénero *Eubates*, las verdaderas moras. El número de cromosomas se encontró como una serie regular de múltiplos del número básico 7, oscilando entre 14 y 63 en las especies estudiadas. Una tercera parte de las especies fueron triploides con un número somático de 21. Plantas tetraploides, es decir con 28 cromosomas fueron las siguientes en ocurrencia, seguido también de las plantas pentaploides. Plantas con 14, 49 y 63 cromosomas ocurrieron de manera menos frecuente en el material examinado.

Heslop-Harrison en 1953 presenta 217 determinaciones de lo taxa británicos de *Rubus*, en Bretaña el grado de poliploidía va desde diploide hasta hexaploide, siendo un 90.7% tetraploides.

Thompson en 1961 obtuvo el número de cromosomas de las especies rastreras de mora. 'Young' ($2n=49$) 'Boysen' ($2n = 49$), 'Nectar' ($272 = 49$) y las formas relacionadas que incluyen los parentales de 'Young', 'Phenomenal' ($2n = 42$) and 'Mayes' ($2n = 56$) con el fin de aclarar los orígenes de estas variedades comercialmente importantes y analizar su potencial como material para cruzamiento.

Thompson M. y Zhao C. realizaron el conteo de cromosomas para algunas especies de *Rubus* de Guihou y de otras especies chinas; además resume conteos publicados de todas las especies chinas del género. El rango de ploidía va desde $2x$ hasta $14x$, encontrando en su mayoría altos niveles de poliploidía. En este trabajo se reporta el número de cromosomas de *R. rosifolius* $2x$ ($2n=14$).

Itwasubo Y. y Naruhashi N. en 1993 examinaron el número de cromosomas de 36 especies y 17 híbridos naturales de *Rubus* japonesas cultivadas en el Jardín Botánico de la Universidad de Tayama. De las 36 especies pertenecientes a 4 subgéneros, 28 resultaron ser diploides, 4 tetraploides y el resto poliploides.

En 1995 Thompson realiza un reporte del número de cromosomas de 201 plantas pertenecientes al **National Clonal Germplasm Repository (NCGR)** que representan 114 taxa de *Rubus* (incluyendo especies y variedades). De los taxa identificado, 42 son nuevos conteos, mientras que el resto son confirmaciones de estudios anteriores. El número cromosómico básico fue 7 y los niveles de ploidía van de $2x$ a $12x$.

En este estudio son reportados los conteos para algunas de las especies suramericanas: *Rubus adenotrichos* (14), *R. robustus* (14), *R. urticifolius* (14), *R. rosifolius* (14) y para el híbrido natural inter-subgenérico *R. glaucus* (28).

Nuevamente Thompson en 1995 reporta el número de cromosomas para 90 cultivares y selecciones de *Rubus* mantenidas en el **National Clonal Germplasm Repository (NCGR)** del Departamento de Agricultura de Estados Unidos; 30 de los conteos son nuevos, incluyendo 5 correcciones de trabajos previos, 30 son confirmaciones. El número básico fue 7 y la ploidía varió desde 2x hasta 14x.

Thompson M.M. en 1997 realiza una compilación bibliográfica de los conteos cromosómicos elaborados para las especies de *Rubus*. Se presenta el número de cromosomas (conteo) de 387 especies que representan un 40% del número total de especies; incluye 11 de los 12 subgéneros existentes. El número básico es 7 y los niveles de ploidía varían desde 2x hasta 14x y presumiblemente 13x y 18x.

El objetivo del trabajo era proporcionar un resumen de la información disponible en el campo de la citogenética, así como también señalar los principales vacíos en el tema y la mejor forma de llenarlos.

Alice y Campbell en 1997 reportaron el número de cromosomas para 49 de las 57 especies que utilizaron para su estudio de filogenia de *Rubus* con ITS núcleo-ribosomales, 20 de ellas del subgénero *Rubus* y de 1 a 7 especies de los 11 subgéneros restantes, los rangos de ploidía encontrados van desde diploides hasta dodecaploides; 38.8% resultaron ser diploides, 42.9% poliploides y 18.3% entre diploides y poliploides.

Nuevamente Itwasubo Y. y Naruhashi N, esta vez en el 2002 documentan el número de cromosomas de 31 especies del género *Rubus* en Taiwán. El

subgénero *Chamaebatus* resultó principalmente hexaploide, en *Malachobatus* se encontraron tetraploides, hexaploides y octoploides, e *Idaeboatus* resultó uniformemente diploide.

Marulanda y colaboradores, reportan el resultado de un análisis molecular llevado a cabo con AFLP'S y marcadores SSR de especies de *Rubus* silvestres y cultivadas, colectadas en los Andes centrales de Colombia. Adicionalmente se establecieron estrategias para el uso sostenible y conservación de los recursos genéticos de *R. glaucus* y especies relacionadas, generando información sobre el estado actual de sus poblaciones, su uso y distribución y otros datos considerados indispensables para un avance en los programas de mejoramiento de esta especie.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo de manera simultánea en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Ambientales de la Universidad Tecnológica de Pereira y en los Laboratorios de Biología de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad del Quindío.

Las plantas utilizadas en este trabajo fueron colectadas en varias localidades del Quindío, Risaralda y Caldas (Tabla 2), en salidas de campo realizadas en trabajos de investigación previos; fueron llevadas y mantenidas en el Vivero perteneciente a la Universidad Tecnológica de Pereira.

Tabla 2. Lugares de procedencia de las plantas de *Rubus glaucus* utilizadas en este estudio

LUGAR DE COLECTA	DATOS DE COLECTA
Santa Rosa (Risaralda)	Cultivo para obtención de acodos, mora sin aguijones
Barrio Boquerón Salento (Quindío)	Altitud: 2014 m, N: 4° 38'6.2", W: 75° 34'12.9" Mora con aguijones cultivada por colino.
SENA Manizales, procedencia Quindío	Mora sin aguijón, plantas de aproximadamente 150 cm de altura, edad 1.5 años, flores/rama 48, frutos por rama 70, no se conoce la productividad.
Corpoica SENA Manizales	Mora con aguijones variedad San Antonio, altura de la planta 128 cm, 4 años de edad, flores por rama 50, frutos por rama 50, productividad 190Kg/450 planta.
Alto Manzano, Esmeralda Osorio (Risaralda)	Mora con aguijones, altura de la planta 2.0 mt, edad 4 años, flores por rama 40, frutos por rama 60, productividad 300kg/1800 plantas, plantas sanas.
Génova (Quindío) Vereda Cumaral Bajo, Procedencia Calarcá	Mora sin aguijones. Planta de 150 cm de altura, 1.5 años, 50 flores por rama, 70 frutos por rama, se desconoce su productividad.
Villa María (Caldas) Vereda Papayal Procedencia Santa Rosa	Mora sin aguijones. Planta de 120 cm de altura, 2 años, 52 flores por rama, 75 frutos por rama, se desconoce su productividad y no se sabe de enfermedades en el cultivo.

5.1 ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS CITOGENÉTICAS

Este estudio se realizó desarrollando la técnica de aplastado de raíces o “squash”, para la obtención de cromosomas metafásicos mediante la modificación de las diferentes técnicas de colecta, pretratamiento, fijación, hidrólisis y tinción.

5.1.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron varias técnicas para la obtención de material vegetal (raíces y hojas), dado que las plantas adultas, bien sea en estado silvestre, o en cultivo, no proveían el material requerido en buenas condiciones.

5.1.1.1 Semillas

En primer lugar, se utilizó como material vegetal, semillas certificadas de mora de castilla, Lote 22(%germ 60, % pureza 90), suministradas por la empresa de productos agrícolas “El Semillero”.

Se establecieron dos ensayos de germinación, uno en oscuridad y otro en luz cada uno con dos repeticiones; en cada ensayo se colocaron 10 semillas previamente pre tratadas (sumergidas en agua por 24 horas), en cajas de petri con papel absorbente humedecido con agua destilada.

Se realizaron observaciones durante los 15 días posteriores a la siembra.

Se realizaron 2 ensayos más de germinación siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente y adicionándole Vitavax para evitar la contaminación por hongos.

5.1.1.2 Estacas y acodos

Por otro lado, se sembraron estacas de 30-40cm de *Rubus glaucus* en bolsas, las cuales fueron mantenidos en vivero; con el fin de inducir la producción de raíces óptimas para los análisis citogenéticos.

Con el mismo objetivo se establecieron estacas de 6-8 cm con enraizador AIA en concentraciones 0.2 y 0.4 en cajas de Petri , estas fueron tenidas en incubadoras para asemejar condiciones de oscuridad y favorecer el enraizamiento.

Otro método de multiplicación utilizado en este trabajo para lograr la formación de raíces fue la propagación por acodo, que fue llevado a cabo también en el vivero.

5.1.1.3 Cultivo *In Vitro*

También se utilizó como fuente de material vegetal el método de rizogénesis foliar *In vitro*) rizogénesis foliar *in vitro* en medio de soluciones minerales completas propuestas por Murashige y Skoog (1962), complementado con ácido indol acético (AIA) en una proporción de 0.5mg/L

Los ápices radiculares en cada uno de los casos, fueron cortados con ayuda de pinzas, bisturí y un estereoscopio para mayor precisión.

5.1.2 DETERMINACIÓN DE LA HORA DE CORTE

Se realizaron ensayos a diferentes horas del día (6:00 a.m, 8:00 a.m, 10:00 a.m, 12:00 m.d, 2:00 p.m, 3:00 p.m) y conteos de células en actividad mitótica en un campo microscópico de 100x, para así determinar la mejor hora de corte de los ápices radiculares; y observar las células de este tejido

en metafase, la cual es la fase de la mitosis en la que se observan mejor los cromosomas.

5.1.3 PREFIJACIÓN O PRETRATAMIENTO

Para la fase de Pretratamiento se utilizaron tres agentes inhibidores de mitosis a diferentes tiempos de exposición: colchicina 0.1%, 8-hidroxiquinolina 0.002M y agua fría (Tabla 3).

Tabla 3. Ensayos de pretratamiento con tres tipos de inhibidores en diferentes tiempos de exposición.

Pretratamiento	Tiempo de exposición	Temperatura
8-Hidroxiquinolina	1 hora	AMBIENTE
	2 horas	
8-HQ (en papel filtro y en oscuridad)	3 horas	
	4 horas	
Colchicina 0.1%	1 hora	
	2 horas	
	3 horas	
Agua fría	24 horas	

5.1.4 FIJACIÓN

Para la fijación de los cromosomas se utilizó la Solución de Farmer (etanol absoluto y ácido acético glacial en proporción 3:1) variando el tiempo y la temperatura de exposición (Tabla 4).

Tabla 4. Ensayos de fijación con Farmer a diferentes temperaturas y tiempos de exposición.

Fijación	Tiempo de Exposición	Temperatura
Farmer	15 minutos	60°C
	24 horas	3°C (nevera)
	24 horas	T° ambiente
Alcohol 70%	24 horas	T° ambiente

5.1.5 MACERACIÓN O HIDRÓLISIS

Se emplearon dos tipos de hidrólisis: ácida y una mezcla de ácida con enzimática; en el primer caso se utilizó HCl 1N a 60°C por 10 minutos, en el segundo caso además de la ya mencionada hidrólisis ácida se empleó una mezcla de macerozima (0.2%), celulasa (0.2%) y pectinasa (0.1%) a 37°C por varios intervalos de tiempo: 10, 20 y 30 minutos, en una cámara húmeda elaborada manualmente. Se realizaron dos enjuagues con EDTA 1mM.

5.1.6 TINCIÓN

Para la coloración de los cromosomas se evaluaron tres tintes: Orceína acética, Reactivo de Feulgen y Acetocarmín por un tiempo máximo de 30 minutos en oscuridad y calentando cuando fuera necesario.

5.1.7 APLASTADO O SQUASH

Después del proceso de coloración, el “squash” convencional se realizó entre el porta y el cubreobjetos, para así dispersarlos y al hacerse visible se encontraron en un mismo plano.

Las placas obtenidas fueron selladas con esmalte de uñas o Euparal para una mayor preservación de la muestra.

5.1.8 OBSERVACIÓN

La muestra preparada se analizó bajo un microscopio óptico, inicialmente a un aumento de 10X x 10X para buscar células contables, luego a un aumento mayor 10X x 40X con el fin de seleccionar las mejores células y finalmente con el objetivo de inmersión 10X x 100X para realizar el recuento.

5.2 ENSAYOS CON YEMAS FOLIARES

Adicionalmente, se realizaron algunos ensayos utilizando como tejido meristemático yemas foliares; las cuales fueron extraídas de plantas jóvenes de *R. glaucus* que se tenían en vivero.

Las yemas jóvenes eran retiradas del tallo con ayuda de un estereoscopio y unas pinzas; las hojas fueron removidas hasta dejar solo el primordio; el protocolo seguido para la observación de los cromosomas fue el propuesto por Fukui y Nakuyama (1996) con algunas modificaciones, muy similar al utilizado para ápices radiculares.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS CITOGENÉTICAS

6.1.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Los cromosomas de la célula de un organismo son más evidentes cuando ésta se encuentra en división mitótica, de tal forma que se deben utilizar tejidos meristemáticos que se caracterizan por encontrarse en constante mitosis, poseer núcleos grandes y permanecer indiferenciados. (Valladolid *et.al.* 2004); en este caso se utilizaron ápices radiculares por cumplir con dichas condiciones.

Sin embargo un gran obstáculo para observar los cromosomas en *Rubus*, así como en otros géneros como *Amaranthus* (Tatum, 2005), es que las especies tienden a tener raíces delicadas y muy pequeñas. Al remover las raíces del suelo, los ápices, que contienen el tejido meristemático a menudo se pierden; las raíces en las que los ápices no se pierden tienen pocas células, lo que decrece la probabilidad de obtener cromosomas dispersos.

Debido a esto se emplearon diversas técnicas que favorecieran la producción de raíces en buenas condiciones, aptas para su procesamiento y de este modo asegurar la disponibilidad del material vegetal.

6.1.1.1 Semillas

Las semillas establecidas en cajas de petri no presentaron los resultados esperados, pues al cabo de cuatro semanas se encontró un alto grado de contaminación por ataque de hongos principalmente. Después de un seguimiento prolongado a los diferentes tratamientos no se observó emisión de radícula, o indicios de germinación en ninguno de los casos.

Bernal (1966) plantea que la mora se puede reproducir sexual y asexualmente, pero aún cuando las plantas se pueden reproducir por semilla, este sistema no es muy aconsejable por las siguientes razones:

- a. La semilla de la mora tiene un período de germinación muy largo.
- b. El porcentaje de germinación (viabilidad) es relativamente bajo.
- c. El desarrollo de las plantas provenientes de semilla es bastante lento si se compara con los métodos asexual o vegetativo. (Bernal, 1966)

Einset (1951) plantea que las semillas de mora normalmente no germinan fácilmente hasta el segundo año después de ser plantadas, por lo que para los objetivos de este trabajo, este método de obtención de material vegetal se descartó.

6.1.1.2 Estacas y Acodos

Del mismo modo, el establecimiento de acodos y estacas de *R. glaucus* en tierra, para la obtención de ápices radiculares no produjo resultados efectivos, al cabo de 30 días del montaje se encontró una muy baja producción de raíces; además de que éstas mostraron características no aptas para los ensayos de laboratorio. Las plantas no propagadas por esos métodos no presentaron óptimo desarrollo.

Bernal (1966), afirma que los ensayos de propagación por estaca no tienen mucho éxito, pues al parecer en el enraizamiento y el brote de las primeras hojas y ramas, se consumen las reservas perdiendo su vigor para poder desarrollarse, por lo cual finalmente mueren.

Las estacas establecidas con AIA a pesar de que fueron sometidas a procesos de desinfección previos, presentaron altos grados de contaminación.

Estas estacas fueron mantenidas en oscuridad para asemejar las condiciones que encontrarían en el suelo y de ese modo acelerar la producción de raíces, sin embargo las produjeron en muy bajo número. Estas raíces, además de ser muy pocas, eran muy pequeñas por lo que no fueron consideradas como la fuente más adecuada de material vegetal.

6.1.1.3 Cultivo In Vitro

El uso de medios de cultivo *in vitro*, con medio enriquecido con auxinas (AIA 1mg/l+AIB 1mg/l) se ha convertido en una fuente eficiente para la producción de raíces, la menor consistencia de la pared celular la hace apropiada para estudios citogenéticos.

Sin embargo, las raíces obtenidas a través de cultivo In vitro no fueron la mejor herramienta durante el desarrollo de este estudio; la resolución de los cromosomas fue muy inferior a lo obtenido con plantas de vivero.

Las raíces producidas por las plantas en bolsa mantenidas en vivero fueron las que presentaron mejor color, mayor tamaño, consistencia, y por consiguiente mayor facilidad a la hora de manipularlas. Se emplearon ápices de raíces secundarias cuando estuvieron disponibles, ya que es importante tener en cuenta que tiempos muy prolongados de desarrollo, ocasionan una gran proliferación de las raíces secundarias, pero estas muestran una tendencia a adelgazarse, lo cual dificulta su manejo (Rodríguez, Bueno *in litt*).

En la Fig N. 3 se presenta cada uno de los métodos de propagación utilizados.

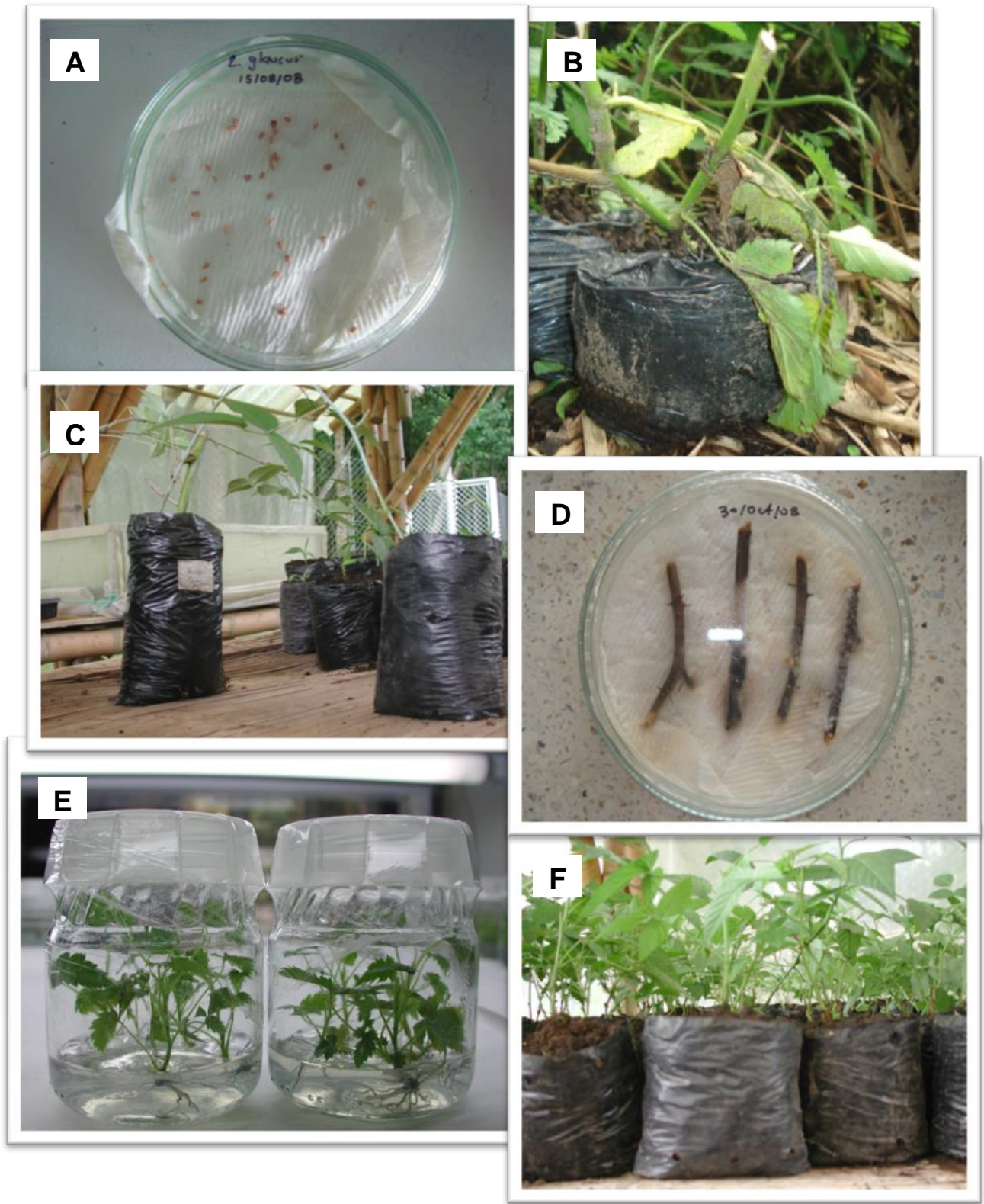


Fig. 3 Métodos de propagación utilizados para la obtención de ápices radiculares **A.** Semillas **B.** Estacas **C.** Acodos **D.** Estacas con Enraizador **E.** Cultivo In vitro **F.** Plántulas en bolsa.

En la tabla N 4 se presenta un resumen de los resultados obtenidos con cada uno de los métodos de propagación utilizados.

Tabla 5. Obtención de raíces en cada uno de los métodos de propagación utilizados.

FUENTE DEL MATERIAL VEGETAL	Obtención raíces	
	SI	NO
Germinación Semillas		X
Establecimiento Acodos en tierra		X
Establecimiento Estacas en tierra		X
Establecimiento con AIA en oscuridad		X
Cultivo In vitro	X	
Plántulas en bolsa (vivero)	X	

6.1.2 DETERMINACIÓN DE LA HORA DE CORTE

La mayor cantidad de células mitóticas se observaron en raíces colectadas entre las 8:00 y 9:00 de la mañana. Después de esta hora, la cantidad de células en mitosis era menor por campo microscópico y en las horas de la tarde fue casi nulo, predominando las células interfásicas (Fig.4).

Esto puede ser explicado por el umbral de absorción de nutrientes y agua para suplir las necesidades en las diversas rutas metabólicas, por lo cual se incrementa la división celular en los ápices radiculares, en ese rango horario (Rodríguez, Bueno *In litt*).

Swanson *et al.* (1981) (citado por Molero *et al.* 2006) indicó que el momento del día en el cual las células se multiplican con mayor rapidez varía de una especie a otra, pero por lo general, la hora mitótica se encuentra en las horas

de la mañana hasta aproximadamente las 11:00 am, lo que concuerda con lo obtenido en este trabajo.

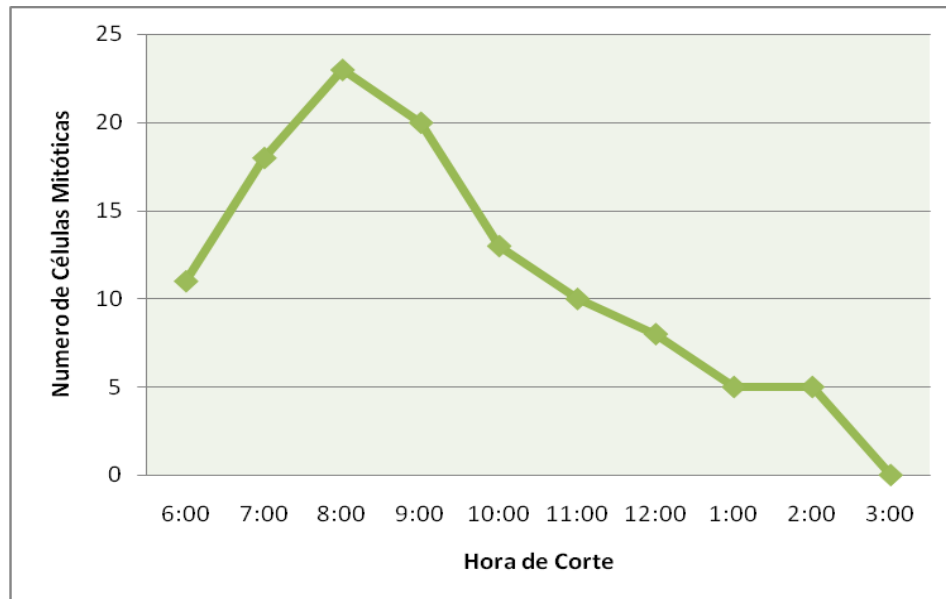


Fig. 4 Numero de células en mitosis (por campo microscópico 100X) a diferentes horas del día.

6.1.3 PRETRATAMIENTO O PREFIJACIÓN

En esta etapa se acumula el mayor número de células metafásicas en el meristemo. En la metafase, los cromosomas alcanzan su máximo grado de condensación, se encuentran individualizados y presentan una forma característica que permite diferenciarlos y clasificarlos morfológicamente. Los inhibidores de mitosis actúan sobre el proceso de formación del huso acromático, impidiendo el paso hacia la anafase y causando el acortamiento y dispersión de los cromosomas (Valladolid, *et al.* 2004).

Los dos inhibidores mitóticos utilizados en la fase de pretratamiento produjeron buenos resultados, pero fue con el uso de la 8HQ 0.002 M por 4

horas a temperatura ambiente donde se encontró mayor acumulación de células en actividad metafásica.

Ensayos citogenéticos realizados por autores tales como, Naruhashi, *et al* (1993, 2002) y Thompson (1993, 1995, 1997) demuestran que la 8HQ es utilizada con mayor frecuencia dentro del género *Rubus*, y por lo tanto ofrece mejores resultados.

De acuerdo con Singh (1993), la 8 Hidroxiquinolina es muy útil en análisis cromosómicos porque permite una buena visualización de las constricciones secundarias, además permite un mejor empaquetamiento de los cromosomas; la colchicina tiende a inducir aglomeraciones cromosómicas, las cuales son muy pronunciadas después de largos tratamientos. (Aarestrup, *et al* 2008.)

6.1.4 FIJACIÓN

En esta etapa se interrumpen rápidamente los procesos vitales de la muestra conservando invariable la estructura fina de las células, además se incrementa la naturaleza basófila de la cromatina haciéndola susceptible de ser coloreada. (Valladolid *et al.* 2004).

El tiempo de fijación más efectivo con Farmer es de 24 horas a 3°C. Por regla general, en citogenética es de gran interés principalmente realizar observaciones de morfología, asociación y número de cromosomas, por lo que es de gran utilidad un fijador de acción rápida y violenta; de reacción ácida y deshidratante, que conserve el nucléolo, los cromosomas y el huso acromático, uno de los fijadores más comúnmente utilizados por cumplir con estas características es el Reactivo de Farmer (García, 1988).

Se requiere un mínimo de 3 horas a temperatura ambiente para fijar el material (Haskells y Wills, 1968), sin embargo es conveniente dar de 24 a 48 horas en este proceso para facilitar la dispersión de los cromosomas en el citoplasma (García, 1988), si este tiempo es excedido y no se conserva a bajas temperaturas o se transfiere a alcohol se corre el riesgo de que el material se deteriore.

6.1. 5 HIDRÓLISIS

Al momento de observar los cromosomas bajo el microscopio óptico, es importante que las células se encuentren dispersas formando una sola capa de células, evitando así la superposición. Para lograr este objetivo se deben destruir tanto la pared celular y la pectina de las uniones intercelulares. Para tal efecto se pueden utilizar agentes químicos o tratamientos enzimáticos, o mezclas de ambos. (Valladolid *et al.* 2004).

Se determinó que era indispensable el proceso de hidrólisis ácida con HCl por 15 minutos a 60°C, reforzado con una hidrólisis enzimática por 20 minutos a 37°C, ya que de lo contrario la pared celular no sería suficientemente degradada.

El objetivo principal de esta hidrólisis es precisamente eliminar tejido que impida una perfecta visualización de los cromosomas, la pared celular es entonces una de las barreras más importantes durante este proceso, ésta es el resultado de un proceso evolutivo producto de las interacciones con fitopatógenos, con otros organismos y con las condiciones ambientales que se presentan como elementos seleccionadores, por lo cual, las paredes han generado resistencia a agentes químicos- enzimáticos como los empleados en la hidrólisis (Rodríguez, Bueno *In litt*).

Este proceso es también utilizado para suavizar los ápices radiculares y de ese modo favorecer el squash, es muy usado antes de tinción con orceína o carmín (Haskells y Wills, 1968).

6.1.6 TINCIÓN

El mejor método de tinción empleado fue calentar el reactivo de Feulgen por 5 min y luego realizar contra tinción con acetocarmín por 30 minutos en oscuridad.

Haskells y Wills (1968) reportan la técnica Feulgen como una técnica que produce resultados más estéticos, aunque su defecto incluye la posibilidad de que pueda ser un poco más prolongado y falla al momento de teñir pequeños cromosomas.

Por comparación, cromosomas tratados con otros colorantes pueden parecer más densos, pero el citoplasma y el contenido de la célula pueden también teñirse y producir un contraste inferior. En este caso la combinación de las propiedades de los dos colorantes permitió una mejor observación al microscopio.

6.1.7 OBSERVACION DE CROMOSOMAS

Debido al pequeño tamaño y a la gran cantidad de cromosomas que presenta este material, se hizo un conteo estimado del número de cromosomas.

Rubus glaucus exhibió una dotación de 28 cromosomas, teniendo el género como número básico 7, esta especie es entonces considerada tetraploide (4n).

El conteo presentado aquí para *R. glaucus* (4x), confirma previos reportes. Thompson (1997) en su revisión de las especies de *Rubus*, expone la tetraploidía para esta especie; sin embargo el autor plantea que las especies que no han sido obtenidas a partir del campo, si no por el contrario de fuentes secundarias como jardines botánicos, viveros o cultivadores de plantas están probablemente identificados incorrectamente, por lo que se hace necesario realizar confirmaciones.

Adicionalmente estos resultados corroboran los niveles de ploidía propuestos por Marulanda *et al* (2007), por el cual sugieren genotipos tetraploides en el germoplasma de especies silvestres y cultivadas de *Rubus glaucus*, con base en datos obtenidos a través de marcadores moleculares.

Por otro lado, es de resaltar que no se hallaron diferencias en el número de cromosomas entre las procedencias utilizadas, todos presentaron una dotación de 28 cromosomas, sin embargo para generar hipótesis acerca de su variación real o su diferenciación por ecotipos sería indispensable un estudio de la morfología de los grupos de cromosomas de cada una de las procedencias de *Rubus glaucus* del Eje Cafetero.

El análisis de los cariotipos en algunos grupos de plantas ha sido entorpecido por el pequeño tamaño de los cromosomas, o por su alto número (como en el caso de los poliploides). (Aguiar, 2006). Heslop-Harrison en 1953 reporta que *Rubus* no provee material favorable particularmente para estudios de morfología de cromosomas a causa del pequeño tamaño de ellos (aprox. 1.5-2.0 μ). Sin embargo, un apropiado trabajo de pretratamiento con inhibidores del huso mitótico y procedimientos de maceración de meristemas apicales permite el conteo del número de cromosomas en estos grupos de plantas (Aguiar, 2006).

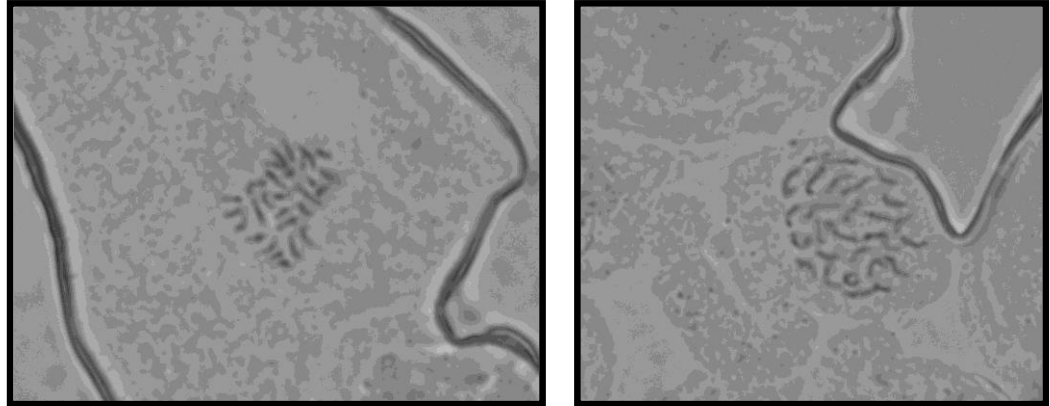


Fig. 5 Cromosomas somáticos de *R. glaucus* con $4n$ (28)

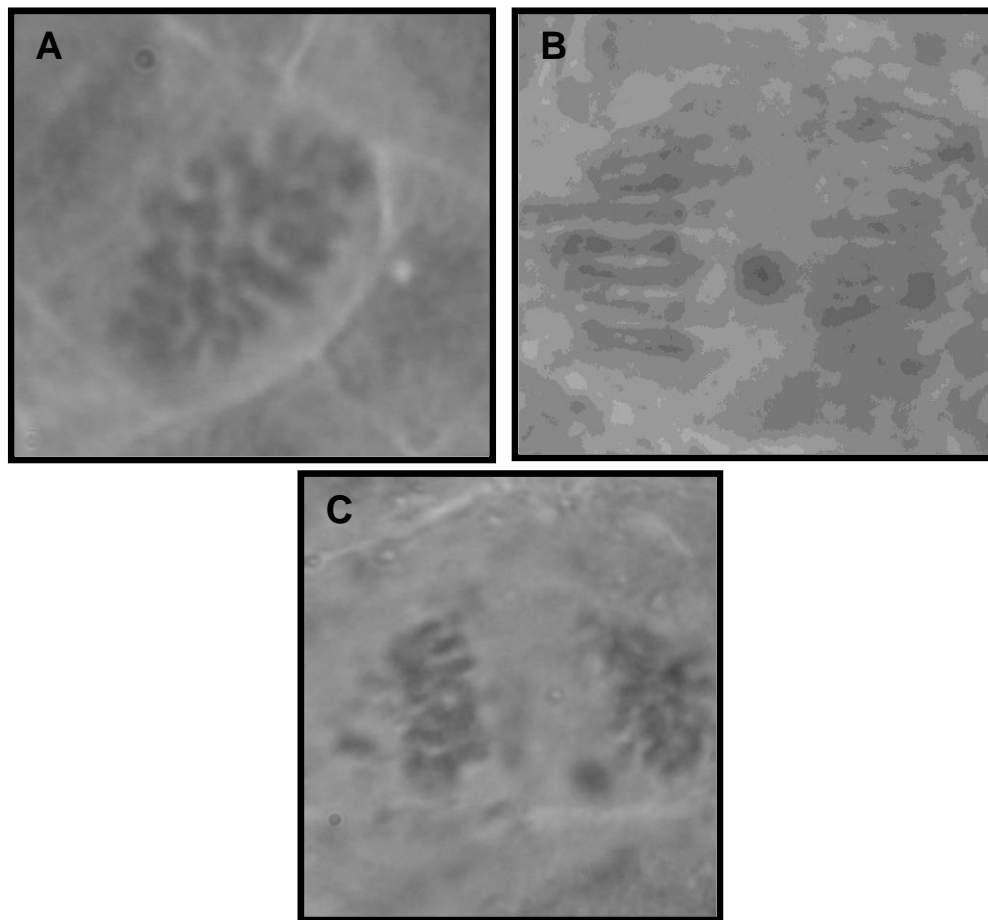


Fig 6. Otras Fases de la Mitosis en *R. glaucus*. **A.** Interfase. **B.** Telofase. **C.** Anafase.

6.2 ENSAYOS CON YEMAS FOLIARES

Cuando los ápices radiculares no siempre se encuentran disponibles para el análisis de las divisiones celulares, los ápices de los tallos en crecimiento (yemas) a menudo proveen meristemas adecuados, sin embargo su manejo se hace mucho más complicado.

En este caso se presentaron dificultades a la hora de retirar las hojas que recubren el primordio foliar; en muchas ocasiones quedaba demasiado tejido, que aun al ser expuesto a doble hidrólisis no era degradado, y que por consiguiente perjudicaba el “squash” y las placas obtenidas presentaban una gran cantidad de células somáticas más no meristemáticas.

Es tal vez por ese motivo que los ensayos citológicos a partir de yemas foliares son muy escasos y poco exitosos.

Para finalizar cabe anotar que este trabajo genera un gran aporte la caracterización de *Rubus glaucus*, ya que la realización de programas de mejoramiento genético en plantas requiere del conocimiento de la constitución cromosómica de la especie, por ejemplo Gupton (1989) propone que cruces interespecíficos entre *Rubus* con números de cromosomas diferentes o por debajo del nivel hexaploide son generalmente fallidos.

Además, teniendo en cuenta que cruzando las especies cultivadas con sus parientes silvestres y manteniendo registro de su comportamiento citológico y genético; puede ser posible obtener información que podría dar a los genéticos una clara percepción del mecanismo de la herencia, lo que podría llevar a resultados económicos invaluable. (Aase and Powers, 1926)

Adicionalmente también se contribuye al estudio de la citogenética en Colombia, dado que existe una cantidad limitada de trabajos realizados en esta área; evidenciando la necesidad de más investigaciones genéticas y citológicas, en un sinnúmero de especies.

7. CONCLUSIONES

Los ápices radiculares obtenidos de plántulas de bolsa mantenidas en vivero fueron la mejor fuente de material vegetal para el conteo de los cromosomas.

Se estableció que la mejor hora de colecta de ápices radiculares para la observación de cromosomas se encuentra entre las 8:00 y las 9:00 de la mañana; es allí cuando se aprecia el mayor número de células en metafase.

El pretratamiento más adecuado es el uso de 8-hidroxiquinolina por 4 horas a temperatura ambiente

En el proceso de Fijación se debe utilizar Solución Farmer durante 24 horas a 3°C

Es necesario una doble digestión; primero ácida con HCl 1N durante 10 minutos a 60°C, seguida de una hidrólisis enzimática a 37°C con un coctel compuesto de celulasa 0.2, peptidasa 0.1 y macerozima 0.2. Se debe lavar en repetidas ocasiones con buffer (EDTA 1mM)

Se encontró que una combinación de dos colorantes facilitaría la observación de los cromosomas: Reactivo de Schiff o Feulgen por 5 minutos (calentar), contratinción con acetocarmín (30 min oscuridad).

Es importante tener en cuenta que entre cada paso es indispensable realizar lavado con agua destilada para eliminar restos de los reactivos utilizados.

Rubus glaucus presenta una dotación de 28 cromosomas, teniendo en cuenta el número base del género (7) es entonces considerada una especie tetraploide (4n), por lo que presenta 4 copias de cada cromosoma.

Las procedencias utilizadas en este trabajo no exhibieron diferencias en el número de cromosomas, todas son consideradas como tetraploides (28 cromosomas).

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar aspectos morfológicos más detallados de los cromosomas de *R. glaucus*, su cariotipo e ideograma.

Se recomienda realizar una revisión citogenética de las especies silvestres que se encuentran en el Eje Cafetero: *Rubus urticifolius*, *R. adenotrichos*, *R. rosifolius*, *R. bogotensis* y *R. robustus*, para la implementación de programas de mejoramiento genético.

Es de vital importancia profundizar el conocimiento sobre la meiosis en *Rubus glaucus*, realizando estudios citogenéticos en anteras para así corroborar el número cromosómico y además el tamaño, tipo y viabilidad del polen.

Realizar un estudio de Citometría de flujo para medir la cantidad de ADN presente en *Rubus glaucus* y evaluar su relación con el nivel de ploidía complementaría la información acerca de esta especie.

9. BIBLIOGRAFÍA

Aarestrup JR, Karam D, Fernandes GW. (2008). Chromosome number and cytogenetics in *Euphorbia heterophylla* L. *Genetics and Molecular Research* 7 (1): pp. 217-222.

Aguilar SB. (2006). Caracterización molecular de *Rubus* spp. En el Eje Cafetero-Colombia. Tesis de Maestría en Biología Vegetal. Universidad del Quindío. Universidad Tecnológica de Pereira. Universidad de Caldas.

Alice LA, Campbell CS. (1999). Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Region Sequences. *American Journal of Botany* 86(1): 81-97.

Ballington JR, Luteyn MM, Thompson K., Romoleroux K., Castillo R (1993) *Rubus* and Vacciniaceous germplasm resources in the Andes of Ecuador. *Plant Genetic Resources Newsletter* 93: 9-15.

Bernal JH. (1966). La mora de Castilla. *Rev. Nal. Agricultura* N° 737. Pp.29-34.

Cordova J H, Lamas G. (1997). Citogenética, Filogenia, Calsificaciones Naturales y Evolución de las especies. *Alma Mater* (13-14): pp. 95-112.

Einset J. (1951). Apomixis in American Polyploid Blackberries. *American Journal of Botany*, Vol. 38, No. 10. pp. 768-772.

Erazo, B. (1983). El cultivo de la mora en Colombia. En: *Memorias Curso Nacional de Frutales* Raúl Salazar. Instituto Colombiano Agropecuario ICA (3): 31-38

Federación Nacional de Cafeteros. (1990). Programa de Desarrollo y Diversificación de Cafeteras. El cultivo de la mora de castilla. Sexta edición.

Franco G, Bernal JA, Gallego JL, Rodríguez JE. (1996). Agronomía del cultivo de la mora. En: Primer Seminario Frutales de clima Frío Moderado. Memorias. Manizales, Octubre 10 y 11.

Franco, G y Giraldo J M. (2002). El cultivo de la mora. Corpoica. 81 p.

Fukui K. Nakuyama S. (eds.). 1996. Plant Chromosomes Laboratory Methods. CRC Press Inc.

Gómez L, Franco M, Rojo H, Hernández L. (2006). Mejoramiento de treinta y una hectáreas de mora en la zona de cordillera del departamento del Quindío para la producción de materia prima industrial con destino a la empresa nacional MEALS de Colombia S.A. Fundación. Codesarrollo. Proyecto alianzas productivas eje cafetero.

Guerra M. (2008). Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenet Genome Res* 120:339–350.

Gupton CL. (1989). Production of non-chimeral colchiploids in *Rubus* species by tissue culture. *Euphytica* 44 : 133 -135.

Hall, HK (1990). Blackberry Breeding. P.p. 249-312 In: Janick (ed), Plant Breeding Reviews Vol.8. Timber Press, Portland.

Hérrnandez, C A. ; Lopera, M E ; Mora, B E y Cárdenas, J F. (2001). Desarrollo de un Protocolo para la Propagación Masiva de la Mora de Castilla Mediante la Utilización del Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro*. Revista Actualidades Biológicas No 21. 22(70):3-12

Heslop-Harrison Y. (1953). Cytological Studies in the Genus *Rubus* L. I. Chromosome Numbers in the British *Rubus* Flora. *New Phytologist*, Vol. 52, No. 1. pp. 22-39.

Hummer K. (1996). *Rubus* diversity. *HortScience* Vol 31(2). April.

Jaimes A, Morales R. (1993). El cultivo de la mora de Castilla. *Agricultura Tropical*. Vol. 30 N° 1.

Longley AE. (1924). Cytological Studies in the Genera *Rubus*. *American Journal of Botany*, Vol. 11, No. 4. pp. 249-282.

Marulanda ML, Aguilar SB, López AM. (2007). Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 7: 243-253.

Mertz C, Cheynier V, Gunata Z, Brat P. (2007). Analysis of Phenolic Compounds in Two Blackberry Species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 55, No. 21.

Molero PT, Molina BJ, Casassa PA. (2006). *Bol. Centro Invest. Biol.* v.40 n.1 Maracaibo.

Mora F, Palma-Rojas C, Jara-Seguel P. (2005). Comparación del cariotipo de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus cladocalyx* (Myrtaceae). *Agricultura Técnica* 65(1):20-25.

Naruhashi N, Itwasubo Y. (1993). Chromosome number of Japanese *Rubus*. *Acta Horticulturae*. 352.

Naruhashi N, Itwasubo Y. (2002). Chromosome number in *Rubus* (*Rosaceae*) of Taiwan. *Acta Horticulturae*. 352.

Oliveros, CM. (2000). Recopilación bibliográfica de seis especies de frutas tropicales; lulo, mora, uchuva, pitaya, guanábana y tomate de árbol. CIAT. Cali. p.p 149

Poehlman J M, D Allen. (2003). Mejoramiento Genético de las Cosechas. 2ª Edición. Limusa. México DF.

Rivera D, Linares E, Carriosa MS, Ramírez C. (1997). Conservación de germoplasmas de moras silvestres (*Rubus* spp). En la cuenca del río El Palmar, Municipio de Ubaque. Universidad Javeriana. Santafé de Bogotá, Cundinamarca, Colombia. En: *Plant Genetic Resources Newsletter*. No. 111: 40-52.

Rodríguez N C. Bueno ML. *In litt*. Estudio de la diversidad citogenética de *Physalis peruviana* (*Solanaceae*). Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Romoleroux, K (1992). *Rosaceae* in the paramos of Ecuador. Academic Press Limited.

Stace C. (2000). Cytology and Cytogenetics as a Fundamental Taxonomic Resource for the 20th and 21st Centuries. *Taxon*, Vol. 49, No. 3, Golden Jubilee Part 1, pp. 451-477.

Tatum TC, Skirvin R, Tranel PJ, Norton M, Rayburun LA. (2005). In vitro Root induction in weedy *Amaranthus* species to obtain mitotic chromosomes. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41:844–847.

Thompson MM. (1961). Cytogenetics of *Rubus*. II. Cytological Studies of the Varieties 'Young,' 'Boysen,' and Related Forms. *American Journal of Botany*, Vol. 48 No.8. pp. 667-673.

Thompson MM, Zhao CM. (1993). Chromosome number of *Rubus* species in Southwest China. *Acta Horticulturae*. 352.

Thompson MM. (1995a). Chromosome Numbers of *Rubus* Cultivars at the National Clonal Germplasm Repository. *Hortscience* 30(7):1453–1456.

Thompson MM. (1995b). Chromosome numbers of *Rubus* Species at the National Clonal Germplasm Repository. *HortScience* 30(7) . 1447-1452.

Thompson MM. (1997). Survey of Chromosome number in *Rubus* (Rosaceae: Rosoideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*. Vol 84. N.1 pp.128-164.

USDA, ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network - (GRIN)* [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?32329> (02 February 2008).

Valladolid A, Blas R, Gonzáles R. (2004). Introducción al recuento de cromosomas somáticos en raíces andinas. En: Seminario J. (ed.) *Raíces Andinas. Contribuciones al conocimiento y la Capacitación. Serie: Conservación y Uso de la Biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una*

década de investigaciones para el desarrollo (1993-2003). N°6. C.I.P. agencia suiza para el desarrollo y la Cooperación. Lima, Perú. pp. 96-99.

Vargas W (2002). Guía ilustrada de las plantas de las montañas del Quindío y los Andes centrales. Universidad de Caldas y Corporación Autónoma Regional del Quindío, Manizales, Colombia, 813p.