

EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL ESTABLECIMIENTO, MULTIPLICACIÓN Y ENRAIZAMIENTO *in vitro* DE MORA (*Rubus glaucus* Benth.)

EVALUATION OF GROWING MEDIA FOR THE *in vitro* ESTABLISHMENT, MULTIPLICATION AND ROOTING OF BLACKBERRY (*Rubus glaucus* Benth.)

Aura Andrade^{1a}, Linda Gómez^{1b}, Yolanda Torres^{1c}, Germán Aguilera-Arango^{2*}

^{1a} Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA, Centro de Investigación Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca, Colombia
<http://orcid.org/0000-0001-5542-3690>

^{1b} Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA, Centro de Investigación Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca, Colombia
<http://orcid.org/0000-0002-2351-5424>

^{1c} Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA, Centro de Investigación Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca, Colombia
<http://orcid.org/0000-0002-9695-3257>

² Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA, Centro de Investigación Palmira, Palmira, Valle del Cauca, Colombia
<http://orcid.org/0000-0002-3942-4658>

* Autor para correspondencia E-mail: gaguilera@agrosavia.co

RESUMEN

La mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth.) es considerada en Colombia como uno de los frutales con mayor potencial agrícola. Sin embargo, no cuenta con esquemas de aseguramiento de la calidad para la propagación de material de siembra. Para dar solución a esta problemática se ha recurrido al uso de herramientas como la propagación *in vitro*. Sin embargo, aún se desconoce la acción que ejercen algunos factores como el medio de cultivo. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar diferentes medios de cultivo para el establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de mora de Castilla, con la finalidad de obtener un protocolo para la producción de material de propagación con características de calidad genética y sanitaria. Para ello, se evaluaron ocho de los principales medios de cultivo basales suplementados con dos concentraciones de reguladores de crecimiento para un total de 16 tratamientos, cada uno con tres repeticiones de 10 unidades experimentales por etapa, los cuales fueron dispuestos en un diseño completamente al azar. Para el establecimiento, el mejor medio de cultivo fue el Murashige y Skoog (MS) en combinación con 2 mg L⁻¹ de ácido giberélico. Para la multiplicación los mejores resultados se observaron en el medio MS suplementado con 0,75 mg L⁻¹ de bencilaminopurina, mientras que para el enraizamiento los valores más altos se presentaron en el medio MS en combinación con 1 mg L⁻¹ de ácido indol butírico.

Palabras clave: Meristemas, micropropagación, plántulas, regulador de crecimiento, *Rubus glaucus*.

ABSTRACT

In Colombia, Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) is considered as one of the fruit crops with the greatest agricultural potential. However, it does not have quality assurance schemes for the propagation and production of planting material. To solve this problem, tools such as *in vitro*

propagation have been used. However, the effect of some factors such as culture medium is still unknown. Therefore, the objective of this study was to evaluate different culture media for the *in vitro* establishment, multiplication, and rooting of blackberry in order to develop a protocol for the production of planting material (genetic and sanitary quality). For this, eight of the main basal culture media supplemented with two concentrations of growth regulators were evaluated. The experiment was established in a completely randomized design with 16 treatments and three replicates of 10 experimental units per stage. For the establishment, the best culture medium was Murashige and Skoog (MS) in combination with 2 mg L⁻¹ of gibberellic acid. For multiplication, the best results were observed in the MS medium supplemented with 0.75 mg L⁻¹ of benzylaminopurine, while the MS medium in combination with 1 mg L⁻¹ of indole butyric acid recorded the highest values for rooting.

Keywords: Meristems, micropropagation, seedlings, growth regulator, *Rubus glaucus*.

INTRODUCCIÓN

La familia Rosaceae comprende más de 100 géneros, los cuales a su vez contienen cerca de 3000 especies, siendo la tercera familia de plantas más importante desde el punto de vista económico en las principales regiones templadas del mundo (Zarei et al., 2017). Uno de los géneros más representativo de esta familia es *Rubus*, el cual cuenta con cerca de 750 especies, entre las que se encuentran algunas de interés ecológico y otras de valor económico, especialmente por su uso como especies frutícolas y ornamentales (Espinosa et al., 2016).

Este género presenta una distribución mundial, donde la mayoría de las especies que lo componen se encuentran en zonas templadas del Hemisferio Norte y tan solo unas pocas especies tienen su origen en el trópico y/o en el Hemisferio Sur (Huang y Hu, 2009). Una de las especies más conocidas y que presenta su origen en el trópico americano es la mora de Castilla (*R. glaucus* Benth), la cual se distribuye principalmente en México, Guatemala, El Salvador, Honduras, Panamá, Ecuador y Colombia (Dotor-Robayo et al., 2016).

En Colombia es posible encontrar mora de Castilla en forma silvestre, desde el departamento del Putumayo en la región de la Amazonía, hasta el Valle del Magdalena en la zona Caribe, siendo posible de cultivar en altitudes entre los 2000 y los 3200 m.s.n.m. (Cancino-Escalante et al., 2015). En este país, la mora de Castilla ha sido catalogada como uno de los frutales con mayor potencial agrícola, especialmente el genotipo con espinas, ya que este material presenta mayores rendimientos y calidad de fruta que el genotipo sin espinas (Grijalba et al., 2010). Sin embargo, como especie cultivable no ha adquirido el grado de desarrollo deseado, debido principalmente a las limitadas ofertas tecnológicas con las que cuenta este cultivo, entre las que se destaca el deficiente sistema de propagación (Cancino-Escalante et al., 2011).

Cabe destacar que la mora de Castilla se propaga tanto de forma sexual como asexualmente. Sin embargo, de acuerdo con Aguilera et al. (2019), el aumento en las capacidades de producción es difícil de lograr si solo depende de la propagación natural a través de la semilla, debido a la baja fertilidad que presentan las semillas y a los largos períodos tanto de germinación, como de desarrollo de las plántulas. Así mismo, la propagación asexual, ya sea mediante el uso de acodos y estacas también presenta algunas limitantes, como la diseminación de enfermedades, que se encuentran de forma endógena en la planta madre, además de la pérdida de variabilidad genética (Vaca y Landázuri, 2013).

En Colombia, la propagación de material de siembra de mora de Castilla se hace tradicionalmente de forma vegetativa, en donde tanto los productores como viveristas realizan el proceso sin estándares de calidad fitosanitaria, además de que las plántulas propagadas carecen de identidad genética por ser generadas a partir de plantas madre sin registros de identificación (Cancino-Escalante et al., 2015). Debido a lo anterior, se requiere hacer uso de alternativas que permitan propagar plantas de mora libres de patógenos y que garanticen la calidad genética, por lo que se considera el uso de la técnica de micropropagación, la cual hace parte de la herramienta biotecnológica del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, con el propósito de obtener material de siembra con características de calidad (Pérez-Moncada et al., 2012).

Aunque en las últimas tres décadas se han desarrollado investigaciones en torno al tema de propagación *in vitro* de *R. glaucus*, aún se desconoce la acción que ejercen algunos factores, como por ejemplo el efecto de los diferentes medios de cultivo basales para establecer una metodología de propagación. A la fecha se han obtenido resultados exitosos en la propagación de esta especie utilizando el medio desarrollado por Murashige y Skoog (1962), pero se desconoce el efecto que tienen otros medios basales de

cultivo para el cultivo *in vitro* de mora de Castilla. Considerando lo descrito anteriormente, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar medios de cultivo basales suplementados con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento para el establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *R. glaucus* genotipo con espinas, con la finalidad de establecer un protocolo para la producción de material de propagación con características de calidad genética y sanitaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación de la zona de estudio

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Producción Vegetal de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Centro de Investigación Tibaitatá, ubicado en el km 14 de la vía Mosquera – Bogotá, en el departamento de Cundinamarca, Colombia, el cual se encuentra a una altitud de 2515 m.s.n.m., latitud Norte 4° 41' 45.10", longitud Oeste 74° 12' 08.20", temperatura media anual de 19°C y precipitación promedio anual de 1216 mm.

Material vegetal

El material vegetal fue colectado en marzo del 2019. Para ello, se seleccionaron esquejes a partir de plantas de mora de Castilla del genotipo con espinas en fase vegetativa y 25 meses de edad, las cuales hicieron parte de un lote experimental establecido en las instalaciones de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Centro de Investigación Tibaitatá, en terrenos de topografía plana. Dentro de los criterios de selección se estableció que, los esquejes debían proceder de ramas jóvenes productivas (conocidas como hembra) que no se encontraran en fase de floración ni fructificación, sin evidencia de deterioro por agentes fitosanitarios (plagas y enfermedades) y que oscilaran en longitud entre 10 y 20 cm. Para evitar el deterioro del material vegetal cosechado, los esquejes fueron dispuestos en una solución de ácido ascórbico a una concentración de 150 mg L⁻¹ al interior de una nevera de poliestireno hasta su posterior traslado a las instalaciones del laboratorio para su procesamiento.

Desinfección

Para la desinfección inicial, los esquejes procedentes de campo fueron sumergidos en una solución de agua con jabón antibacterial por un periodo de cinco minutos. Transcurrido el tiempo, se hicieron tres enjuagues de un minuto cada uno con agua destilada estéril y se dejaron secar. Una vez secos los esquejes, se procedió

a cortar el material vegetal en segmentos más pequeños, cuidando no dañar los meristemas. Es importante indicar que para hacer el corte de cada segmento, se desinfectó el cuchillo con una solución de Yodopovidona al 5% (v/v). Luego, estos esquejes fueron sumergidos en una solución de etanol al 70% (v/v), frotando el material vegetal y eliminando residuos con agitación constante durante dos minutos. Después se eliminó el etanol mediante tres enjuagues de un minuto cada uno con agua destilada estéril. Posteriormente, el material vegetal fue sumergido en una solución de hipoclorito de sodio al 3% (v/v) durante tres minutos. Finalmente, para la eliminación del hipoclorito de sodio se hicieron tres enjuagues por un periodo de un minuto cada uno con agua destilada estéril.

Condiciones de cultivo

Los explantes evaluados inicialmente fueron meristemas apicales, los cuales oscilaron entre 0,3 y 0,6 mm de longitud. Los meristemas fueron extraídos en condiciones asépticas en cámara de flujo laminar con la ayuda de bisturís, pinzas y estereoscopio, haciendo énfasis en la esterilización de las herramientas al terminar la escisión de cada meristemo para evitar contaminación. Los meristemas fueron colocados en ocho medios de cultivo diferentes, de los cuales siete son medios de cultivo basales (Hoagland y Arnon, 1950; Murashige y Skoog, 1962; Gamborg et al., 1968; Nitsch y Nitsch, 1969; Schenk y Hildebrandt, 1972; Quoirin y Lepoivre, 1977; Lloyd y McCown, 1981) y el medio restante es Murashige y Skoog modificado (con el 50% de la concentración de los macroelementos) (Tabla 1). Además de la composición descrita para cada medio basal, todos los medios contenían sacarosa al 3% (m/v), Agar al 0,8% (m/v) y el pH fue ajustado a 5,8 empelándose para ello soluciones de hidróxido de sodio a 0,1N y ácido clorhídrico al 0,1N antes de la esterilización. Posteriormente, los medios de cultivo basales fueron esterilizados en autoclave a vapor húmedo a 121°C durante 20 minutos. Una vez esterilizados, los medios de cultivo fueron suplementados con reguladores de crecimiento dependiendo de la etapa de evaluación. La unidad experimental estuvo constituida de un explante por tubo de ensayo. Cada replica estuvo conformada por 10 unidades experimentales y se establecieron tres replicas por tratamiento, para un total de 30 explantes.

Etapas de establecimiento *in vitro*

Después de la desinfección, los meristemas fueron sembrados en medio de establecimiento. Para ello, se evaluaron los medios basales descritos en la Tabla 1, los cuales fueron suplementados con

Tabla 1. Composición de los medios basales para el establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Rubus glaucus*.**Table 1. Composition of basal media for the *in vitro* establishment, propagation and rooting of *Rubus glaucus*.**

Componente	Reactivo	Composición del medio de cultivo (mg L ⁻¹)							
		MS	QL	WPM	B5	SH	N6	HG	1/2 MS
Macroelementos	Nitrato de Calcio		833,77	386,00				656,40	
	Fosfato de Potasio	170,00	270,00	170,00			400,00		85,00
	Nitrato de Potasio	1900,00	1800,00		2500,00	2500,00	2830,00	606,60	950,00
	Sulfato de Magnesio	180,70	175,79	180,70	122,09	195,40	90,37	240,76	90,35
	Nitrato de Amonio	1650,00	400,00	400,00					825,00
	Cloruro de Calcio anhidros	332,20		72,50	113,24	151,00	125,33		166,00
	Sulfato de Amonio				134,00		463,00		
	Sulfato de Potasio			999,00					
	Fosfato monobásico de amonio					300,00		115,03	
	Fosfato Monosódico de Sodio				130,50				
	Microelementos	Ácido Bórico	6,20	6,20	6,20	3,00	5,00	1,60	2,86
Cloruro de Cobalto		0,03	0,03		0,03	0,10			0,03
Sulfato Cúprico		0,03	0,03	0,25	0,03	0,20		0,08	0,03
Cloruro de Manganeso								1,81	
Sulfato de Manganeso		16,90	0,76	22,30	10,00	10,00	3,30		16,90
Molibdato de Trióxido								0,02	
Yoduro de Potasio		0,83	0,08		0,75	1,00	0,80		0,83
Molibdato de Sodio		0,25	0,25	0,25	0,25	0,10			0,25
Sulfato de Zinc	8,60	8,60	8,60	2,00	1,00	1,50	0,22	8,60	
Hierro	Sulfato Ferroso	27,80	27,80	27,90	27,80	15,00	27,85	5,32	27,80
	Etilendiaminotetraacetato de sodio	37,26	37,30			20,00	37,25		37,26
	Etilendiaminotetraacetato férrico sódico			37,30	37,30				
Vitaminas	Tiamina HCl	0,10			10,00	0,50	1,00		0,10
	Piridoxina HCl	0,50			1,00	0,05	0,50		0,50
	Ácido nicotínico	0,50			1,00	0,50	0,50		0,50
	Myo - Inositol	100,00			100,00	100,00			100,00
	Glicina	2,00					2,00		2,00

MS: Murashige y Skoog; QL: Quoirin y Lepoivre; WPM: Lloyd and McCown's Woody Plant; B5: Gamborg; SH: Schenk y Hildebrandt N6: Chu; HG: Hoagland; 1/2 MS: MS con el 50% de la concentración de los macroelementos.

dos concentraciones del regulador de crecimiento Ácido giberélico (GA3). Las concentraciones evaluadas del regulador de crecimiento fueron 2 y 6 mg L⁻¹, para un total de 16 tratamientos (Tabla 2). Los explantes fueron dispuestos bajo las condiciones de cultivo descritas durante un periodo de doce semanas, luego de las cuales se evaluó el crecimiento de los explantes, mediante la medición de la longitud de los meristemas.

Etapa de multiplicación

Los explantes de la etapa anterior que presentaron buen desarrollo y lograron crecer libres de cualquier tipo de contaminante fueron asignados y transferidos a medio de multiplicación. Para ello, se evaluaron los medios basales descritos en la Tabla 1, los cuales fueron suplementados con dos reguladores de crecimiento, Bencilaminopurina (BAP) a 0,75 mg L⁻¹ y Ácido Indol Acético (AIA) a 1 mg L⁻¹, para un total de 16 tratamientos (Tabla 3). Los explantes

Tabla 2. Medios de cultivo evaluados durante el establecimiento *in vitro* de *R. glaucus*.
Table 2. Culture media evaluated during the *in vitro* establishment of *R. glaucus*.

Tratamiento	Medio Basal	Ácido giberélico (GA3) mg L ⁻¹
T1	MS	2
T2	MS	6
T3	B5	2
T4	B5	6
T5	QL	2
T6	QL	6
T7	WPM	2
T8	WPM	6
T9	SH	2
T10	SH	6
T11	N6	2
T12	N6	6
T13	HG	2
T14	HG	6
T15	½ MS	2
T16	½ MS	6

MS: Murashige y Skoog, QL: Quoirin y Lepoivre, WPM: Lloyd and McCown's Woody Plant, B5: Gamborg, SH: Schenk y Hildebrandt, N6: Chu, HG: Hoagland, 1/2 MS: MS con el 50% de la concentración de los macroelementos.

Tabla 3. Medios de cultivo evaluados durante la multiplicación *in vitro* de *R. glaucus*.
Table 3. Culture media evaluated during the *in vitro* multiplication of *R. glaucus*.

Tratamiento	Medio Basal	Regulador de crecimiento (mg L ⁻¹)
T1	MS	0,75 BAP
T2	MS	1 AIA
T3	B5	0,75 BAP
T4	B5	1 AIA
T5	QL	0,75 BAP
T6	QL	1 AIA
T7	WPM	0,75 BAP
T8	WPM	1 AIA
T9	SH	0,75 BAP
T10	SH	1 AIA
T11	N6	0,75 BAP
T12	N6	1 AIA
T13	HG	0,75 BAP
T14	HG	1 AIA
T15	½ MS	0,75 BAP
T16	½ MS	1 AIA

MS: Murashige y Skoog, QL: Quoirin y Lepoivre, WPM: Lloyd and McCown's Woody Plant, B5: Gamborg, SH: Schenk y Hildebrandt, N6: Chu, HG: Hoagland, 1/2 MS: MS con el 50% de la concentración de los macroelementos, BAP: bencilaminopurina, AIA: ácido indol acético.

estuvieron bajo las condiciones de cultivo descritas durante un periodo de ocho semanas, luego de las cuales se hizo el conteo del número de brotes por tratamiento.

Etapas de enraizamiento *in vitro*

Los explantes resultantes de la etapa de multiplicación fueron divididos y posteriormente sembrados en medio de enraizamiento. Para lo anterior, los medios basales descritos en la Tabla 1 se suplementaron con Ácido Indol Butírico (AIB) en concentraciones de 1 y 4 mg L⁻¹, para un total de 16 tratamientos (Tabla 4). Los explantes estuvieron dispuestos bajo las condiciones de cultivo descritas durante un periodo de ocho semanas, luego de las cuales se hizo la medición de raíces por tratamiento.

Variables de respuesta

Cada tratamiento se dejó en condiciones controladas a una temperatura de 18 ± 2°C, humedad relativa del 60 ± 5%, fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad y una intensidad lumínica de 1800 luxes por un periodo de tres meses para el establecimiento, dos meses para la multiplicación y dos meses para el enraizamiento. La variable de respuesta evaluada durante cada fase se describe en la Tabla 5.

Diseño experimental

Para la selección del mejor medio de cultivo durante el establecimiento, la multiplicación y el enraizamiento, se utilizó un Diseño experimental Completamente al Azar (DCA). Cada repetición correspondió a diez unidades experimentales. La unidad experimental fue definida como cada meristemo introducido en la etapa de establecimiento, el cual permitió continuar con el proceso hasta llegar a la fase de enraizamiento. Para ello, se evaluaron ocho medios de cultivo, cada uno en combinación con dos concentraciones de reguladores de crecimiento para un total de 16 tratamientos por etapa.

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se realizó el supuesto de normalidad y la homocedasticidad mediante la prueba de Shapiro Wilks (95%) y Bartlett (95%), respectivamente. Una vez demostrados estos principios, se procedió a realizar un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias de Tukey (95%). El análisis estadístico se realizó con software econométrico Advanced Analytics Software (SAS) versión 9.4 (SAS Institute, 2018).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento *in vitro*

Pasados 90 días de haber colocado los explantes en los diferentes medios de cultivo, se evidenció que hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos evaluados, donde se pudo observar que el crecimiento de los meristemas fluctuó entre 1,06 y 0,09 cm. De acuerdo con los resultados obtenidos, el máximo crecimiento de los explantes se observó en el tratamiento 1 (medio basal MS en combinación con 2 mg L⁻¹ de GA3), seguido del tratamiento 9 (medio HS con 2 mg L⁻¹ de GA3) y del tratamiento 5 (medio QL con 2 mg L⁻¹ de GA3), mientras que el menor crecimiento se presentó en el tratamiento 11 (medio basal N6 con 2 mg L⁻¹ de GA3) seguido por el tratamiento 4 (medio B5 con 6 mg L⁻¹ de GA3) (Fig. 1).

En la Fig. 1 también se observa que el mayor crecimiento de tejido se presentó en los medios de cultivo con la concentración más baja de GA3 evaluada, lo cual apoya lo descrito por Cisne-Contreras et al. (2007), ya que en sus experimentos obtuvieron los mayores crecimientos en el establecimiento *in vitro* de mora de Castilla haciendo uso de este regulador de crecimiento en bajas concentraciones, debido a que el uso de altas dosis de este componente en el medio de cultivo puede ser letal para los explantes al causar intoxicaciones en los mismos. Con respecto al regulador de crecimiento, los resultados concuerdan con lo descrito por Cancino-Escalante et al. (2015), quienes indican que para el cultivo de meristemas de *R. glaucus*, el medio de cultivo basal MS con presencia de GA3 favorece el crecimiento en longitud de este tipo de explantes, logrando así un buen establecimiento de estas estructuras *in vitro*.

De acuerdo con Dayan et al. (2012), lo anterior ocurre debido a que el ácido giberélico influye en el desarrollo fisiológico, mediante el alargamiento celular, principalmente de entrenudos, además de que incrementa la producción de auxinas a nivel endógeno. Sin embargo, el uso de medio MS suplementado con GA3 en combinación con BAP permite obtener plántulas de mora de mayor altura y con un mejor desarrollo foliar, sugiriendo así que la aplicación de los diferentes tipos de reguladores de crecimiento, así como su combinación en un medio de cultivo son necesarios para la obtención de plántulas viables en la micropropagación (Sigarroa-Rieche y García-Delgado, 2011).

Multiplicación *in vitro*

Transcurridos 60 días después de haber colocado los explantes en los diferentes medios de cultivo para multiplicación, se detectaron

Tabla 4. Medios de cultivo evaluados durante el enraizamiento *in vitro* de *R. glaucus*.
Table 4. Culture media evaluated during the *in vitro* rooting of *R. glaucus*.

Tratamiento	Medio Basal	Ácido Indol Butírico (AIB) mg L ⁻¹
T1	MS	1
T2	MS	4
T3	B5	1
T4	B5	4
T5	QL	1
T6	QL	4
T7	WPM	1
T8	WPM	4
T9	SH	1
T10	SH	4
T11	N6	1
T12	N6	4
T13	HG	1
T14	HG	4
T15	½ MS	1
T16	½ MS	4

MS: Murashige y Skoog, QL: Quoirin y Lepoivre, WPM: Lloyd and McCown's Woody Plant, B5: Gamborg, SH: Schenk y Hildebrandt, N6: Chu, HG: Hoagland, 1/2 MS: MS con el 50% de la concentración de los macroelementos.

Tabla 5. Variables de respuesta evaluadas durante el establecimiento, la multiplicación y el enraizamiento *in vitro* de *R. glaucus*.

Table 5. Response variables evaluated during the establishment, propagation and rooting of *R. glaucus in vitro*.

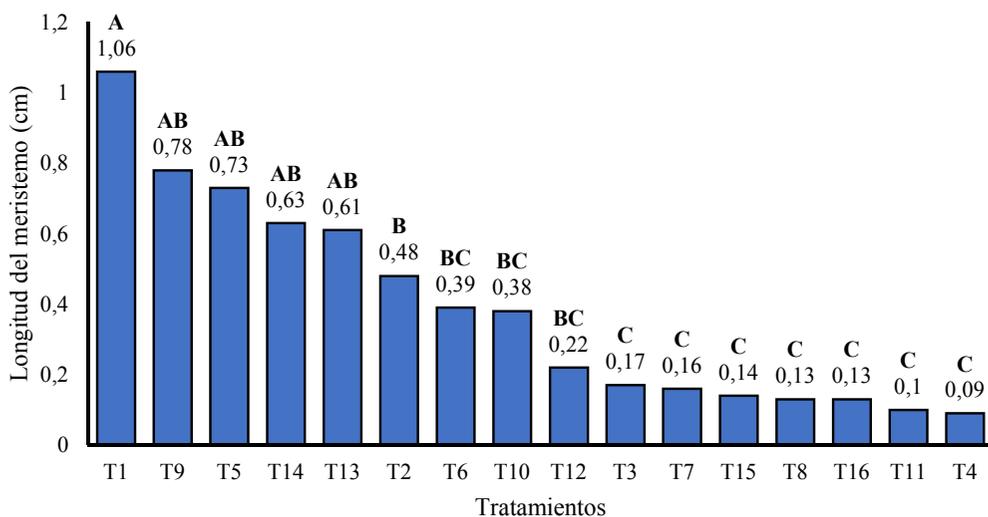
Etapa	Variable Respuesta	Unidad de medida
Establecimiento	Longitud del meristemo	centímetros (cm)
Multiplicación	Número de brotes (acumulados)	Unidades formadas (und)
Enraizamiento	Longitud de raíz	centímetro (cm)

diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos con respecto a la variable número de brotes. Se encontró que el número de brotes formados a partir de los explantes iniciales osciló entre 10,17 y 1,20 unidades, donde se observó que el medio para multiplicación de brotes que presentó el valor más alto fue el tratamiento 1 (medio basal MS en combinación con 0,75 mg L⁻¹ de BAP), mientras que los resultados más bajos se obtuvieron en los tratamientos 15 (medio basal MS al 50% de macroelementos en combinación con el regulador de crecimiento BAP a 0,75 mg L⁻¹) y 16 (medio basal MS al 50% de macroelementos en combinación con 1 mg L⁻¹ de AIA) (Fig. 2).

En la Fig. 2 también se puede observar que a excepción del tratamiento 2, la variable número

de brotes presenta los resultados más altos en los tratamientos donde se utilizó BAP como regulador de crecimiento. Lo anterior concuerda con lo referido por Villa et al. (2005) y Sigarroa-Rieche y García-Delgado (2011), quienes indican que cuando se adiciona BAP al medio MS, se estimula la formación de brotes en mora, lo cual no ocurre en presencia de AIA.

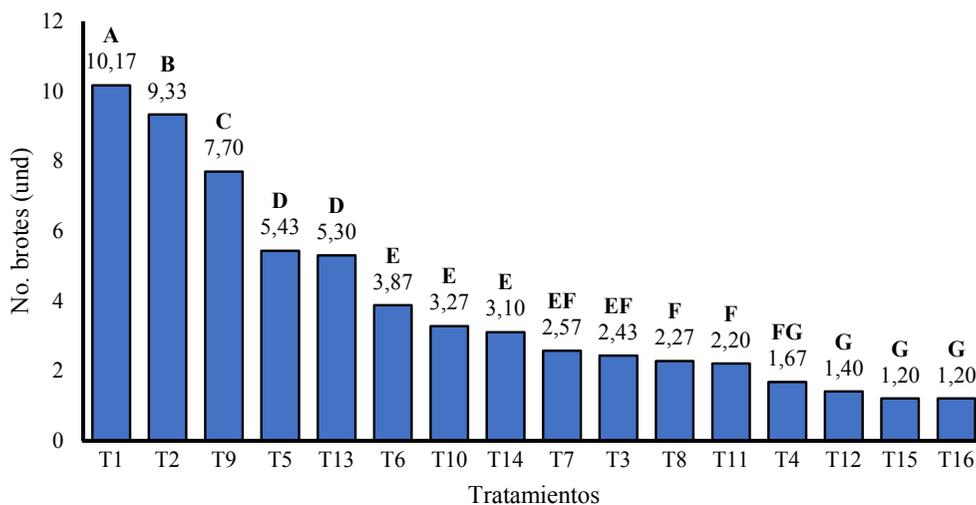
Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la cantidad de brotes obtenidos en el tratamiento 1 fueron superiores a los reportados por Sigarroa-Rieche y García-Delgado (2011), quienes obtuvieron una cantidad máxima de 7,5 brotes cuando sembraron micro estacas de mora sin espinas en medio de cultivo MS suplementado con 1 mg L⁻¹



Los tratamientos con letras diferentes presentan diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fig. 1. Efecto del medio de cultivo en el crecimiento de los explantes para el establecimiento *in vitro* de *R. glaucus*.

Fig. 1. Effect of the culture medium on the growth of the explants for the *in vitro* establishment of *R. glaucus*.



Los tratamientos con letras diferentes presentan diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fig. 2. Efecto del medio de cultivo en el número de brotes para la etapa de multiplicación *in vitro* de *R. glaucus*.

Fig. 2. Effect of the culture medium on the number of shoots for the *in vitro* multiplication stage of *R. glaucus*.

de BAP en combinación con 0,5 mg L⁻¹ de GA3. Lo anterior posiblemente se debe a la interacción entre el medio de cultivo, la concentración del regulador de crecimiento y el genotipo usado en este estudio (mora con espinas), lo que puede

llegar a ser determinante en la variable número de brotes (Cancino-Escalante et al., 2015).

Sin embargo, el número de brotes obtenido en el tratamiento 7 sí corresponden con los resultados informados por Marulanda et al. (2000), quienes

indican que, si se siembran explantes de mora en medio de cultivo basal WPM suplementado únicamente con BAP, provoca una tasa de multiplicación en promedio de solo tres a cuatro brotes por explante.

Enraizamiento *in vitro*

Después de 60 días de haber colocado los brotes resultantes de la etapa de multiplicación en medio de enraizamiento, se encontró que la variable longitud de la raíz presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes tratamientos. Se observó que los valores fluctuaron entre 5,21 y 2,05 cm. Además, no se presentó diferencia estadística entre el tratamiento 1 (medio basal MS en combinación con 1 mg L^{-1} de AIB), el tratamiento 15 (medio basal MS al 50% de macroelementos en combinación con el regulador de crecimiento AIB a 1 mg L^{-1}) y el tratamiento 9 (medio basal HS en combinación con 1 mg L^{-1} de AIB) (Fig. 3).

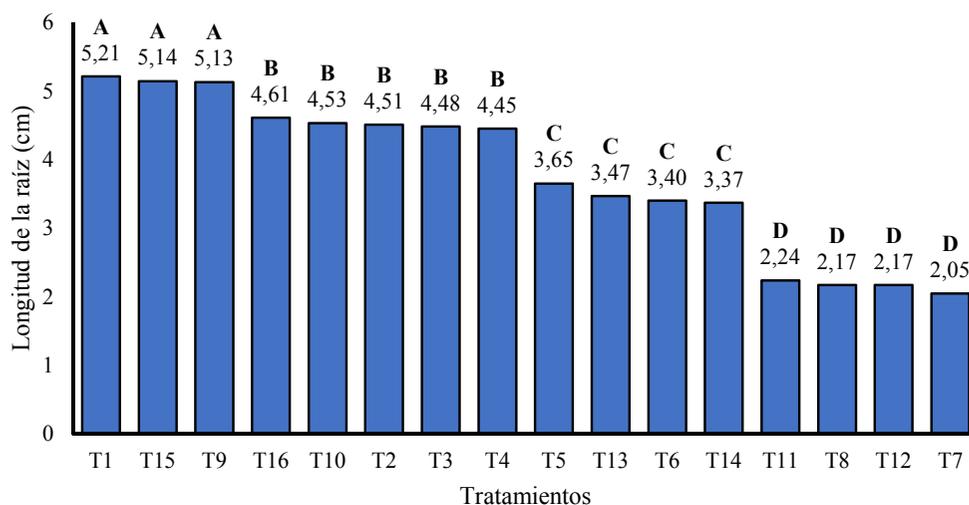
Como se observa en la Fig. 3, en el tratamiento 1 se registran los valores de longitud de raíz más alta. Lo anterior se debe posiblemente a que el medio MS es considerado rico en sales, ya que contiene altas concentraciones de elementos como Nitrógeno Fósforo, Potasio y Calcio en comparación con otros medios de cultivo (Sampayo-Maldonado et al., 2017). De acuerdo con Cardona (2017), la presencia de estos elementos es indispensable para el desarrollo de las diferentes etapas fenológicas en la mora de Castilla, especialmente para la formación de raíces.

Respecto al uso del regulador de crecimiento utilizado en esta etapa de la investigación, los resultados del presente estudio concuerdan con lo obtenido por Flores et al. (2012), ya que reportan las mejores respuestas cuando se suplementó el medio de cultivo con AIB en comparación con otras auxinas como el AIA y el Ácido Naftalen Acético (ANA), al indicar que el uso de AIB en el medio de cultivo promueve la formación de raíces con mayores longitudes.

Sin embargo, referente a la concentración del AIB en el medio de cultivo, la mayor longitud de raíz (5,21 cm) se obtuvo en el medio basal MS suplementado con 1 mg L^{-1} de AIB, lo cual difiere con lo reportado por Cancino-Escalante et al. (2015), ya que en sus estudios ellos obtuvieron las mayores longitudes de enraizamiento (4,07 cm) cuando suplementaron medio MS con 2 mg L^{-1} de AIB. Lo anterior posiblemente se debe al tipo de material vegetal utilizado, debido a que en sus investigaciones ellos evaluaron genotipos de mora con y sin espinas, evidenciando variabilidad de respuesta por efecto del genotipo.

Medio de cultivo basal

De acuerdo con los resultados obtenidos en las diferentes fases del proceso, se pudo observar que en general los medios basales en donde se presentaron mayores respuestas a las variables evaluadas corresponden a los medios MS y SH, mientras que las respuestas más bajas se observaron en los medios WPM y N6. Si se tiene en cuenta lo anterior, de acuerdo con García-



Los tratamientos con letras diferentes presentan diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fig. 3. Efecto del medio de cultivo en el enraizamiento *in vitro* de *R. glaucus*.

Fig. 3. Effect of the culture medium on the *in vitro* rooting of *R. glaucus*.

Cienfuegos (2019), tanto el medio MS como el medio SH presentan gran concentración de sales inorgánicas, los cuales posiblemente suplan los requerimientos nutricionales de *R. glaucus* cuando se induce la propagación *in vitro*. Por el contrario, tanto el medio de cultivo WPM, como el medio N6 con considerados como de baja concentración de macroelementos, especialmente amonio y nitratos, lo que influye directamente en desarrollo de la planta al afectar la elongación de tejidos y producción de órganos (Perez et al., 2010; Martínez-Villegas et al., 2015).

Finalmente, es importante indicar que en la actualidad se cuenta con gran variedad de formulaciones referentes a los medios basales de cultivo de tejidos, pero cada uno tiene una particularidad de uso, por ejemplo el medio B5 se utiliza para el cultivo de callos, mientras que los medios SH y Hoagland se utilizan como sustratos para el establecimiento de plantas con estructuras bien diferenciadas, por lo que posiblemente este tipo de medios basales de cultivo no sean aptos para la propagación de *R. glaucus* a partir de meristemos (Jaiprasert, 2018).

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de estudio evaluadas en la presente investigación, se pudo determinar que para el establecimiento el mejor medio de cultivo fue el MS en combinación con 2 mg L⁻¹ de ácido giberélico; en la etapa de multiplicación los mejores resultados se observaron en el medio MS suplementado con 0,75 mg L⁻¹ de bencilaminopurina, mientras que en la etapa de enraizamiento los valores más altos se presentaron en el medio MS en combinación con 1 mg L⁻¹ de ácido indol butírico, lo que posibilita una metodología *in vitro* para la propagación de material de siembra de mora de Castilla con espinas con características de calidad genética y fitosanitaria.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), especialmente al Departamento de Laboratorios de Investigación y Servicios por financiar la investigación para publicar el presente documento. A los revisores de la revista, cuyas observaciones y sugerencias mejoraron los contenidos desarrollados en el trabajo.

LITERATURA CITADA

- Aguilera-Arango, G.A., E.D. Gómez-López, y A. González-Mejía. 2019. Calogénesis en cultivares híbridos de *Cocos nucifera* L. mediante cultivo *in vitro* de inflorescencias inmaduras. *Biotecnología Vegetal* 19(4):277-284.
- Cancino-Escalante, G.O., L.R. Sánchez-Montaño, E. Quevedo-García, y C. Díaz-Carvajal. 2011. Caracterización fenotípica de accesiones de especies de *Rubus* L. de los municipios de Pamplona y Chitagá, región Nororiental de Colombia. *Universitas Scientiarum* 16(3):219-233.
- Cancino-Escalante G.O., E. Quevedo-García, C.E. Villamizar, y C. Díaz-Carvajal. 2015. Propagación *in vitro* de materiales seleccionados de *Rubus glaucus* Benth (mora de Castilla) en la provincia de Pamplona, región nororiental de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología* 17(2):7-15. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54262.
- Cardona, W.A. 2017. Requerimientos nutricionales (nitrógeno, fósforo, potasio y calcio) en etapa vegetativa y reproductiva de un cultivo de mora (*Rubus glaucus* Benth.), ubicado en el municipio de Silvania (Cundinamarca). Tesis Magister en Ciencias. Escuela de Posgrados, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Cisne-Contreras, J.D., I. Muñoz, y H. Reyes. 2007. Reguladores de crecimiento, L-Cisteína y ácido ascórbico en el cultivo *in vitro* de mora (*Rubus glaucus* Benth). *La Calera* 7(8):59-64.
- Dayan, J., N. Voronin, F. Gong, T.P. Sun, P. Hedden, H. Fromm, et al. 2012. Leaf-induced gibberellin signaling is essential for internode elongation, cambial activity, and fiber differentiation in tobacco stems. *The Plant Cell* 24(1):66-79.
- Dotor-Robayo, M.Y., L.A. González-Mendoza, M.A. Castro, A.C. Morillo-Coronado, y Y. Morillo-Coronado. 2016. Análisis de la diversidad genética de la mora (*Rubus* spp.) en el departamento de Boyacá. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 14(2):10-17. doi:10.18684/BSAA(14)10-17.
- Espinosa, B.N., M.G.A. Ligarreto, M.L.S. Barrero, y C.C.I. Medina. 2016. Variabilidad morfológica de variedades nativas de mora (*Rubus* sp.) en los Andes de Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 10(2):211-221. doi:10.17584/rcch.2016v10i2.4755.
- Flores, D., R. Chacón, V. Jiménez, y F. Ortiz. 2012. Enraizamiento de mora (*Rubus adenotrichus*) en medio líquido en el sistema de inmersión temporal y su aclimatación en invernadero. *Tecnología en Marcha* 25(2):3-9.

- Gamborg, O.L., R. Miller, and K. Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50(1):151-158.
- García-Cienfuegos, B.C. 2019. Evaluación del contenido de papaína, determinación del sexo y metodología para la propagación *in vitro* de tres especies de *Carica*. Tesis Magister en Ciencias. Escuela de Posgrado, Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca, Perú.
- Grijalba, R.C.M., M.L.A. Calderon, y T.M.M. Pérez. 2010. Rendimiento y calidad de la fruta en mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth), con y sin espinas, cultivada en campo abierto en Cajicá (Cundinamarca, Colombia). *Revista Facultad de Ciencias Básicas* 6(1):24-41.
- Hoagland, D.R., and D.I. Arnon. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California Agricultural Experiment Station* 347(2nd ed.).
- Huang, J.Y., and J.M. Hu. 2009. Revision of *Rubus* (Rosaceae) in Taiwan. *Taiwania* 54(4):285-310.
- Jaiprasert, A. 2018. Development of duckweed transformation technique for biological application. Thesis for Master's degree in Sciences. Burapha University, Saen Suk, Chonburi, Thailand.
- Lloyd, G., and B. McCown. 1981. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 30:421-427.
- Martínez-Villegas, Y.M., M. Andrade-Rodríguez, M.T. Colinas-León, O.G. Villegas-Torres, A. Castillo-Gutiérrez, y I. Alía-Tejagal. 2015. Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pascuíta (*Euphorbia leucocephala* Lottsy). *Revista Fitotecnia Mexicana* 38(4):369-374.
- Marulanda, M.L., M. Carvajalino, y H. Vento. 2000. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de plantas seleccionadas de *Rubus glaucus* Benth para el departamento de Risaralda (Colombia). *Actualidades Biológicas* 22(73):121-129.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3):473-497.
- Nitsch, J.P., and C. Nitsch. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163:85-87. doi:10.1126/science.163.3862.85.
- Pérez, J., N. Albany, J. Vilchez, S. León de Sierralta, y M. Molina. 2010. Efecto del medio de cultivo en la multiplicación *in vitro* de *Aloe barbadensis* Mill. *Revista de la Facultad de Agronomía de La Universidad del Zulia* 27(3):447-459.
- Pérez-Moncada, U.A., M.M. Ramírez-Gómez, V.M. Núñez-Zarantes, M. Franco-Correa, y G. Roveda-Hoyos. 2012. Evaluación de un sistema para la micorrización *in vitro* en plantas de mora de Castilla (*Rubus glaucus*, Benth). *Universitas Scientiarum* 17(2):140-151.
- Quoirin, M., and P. Lepoivre. 1977. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Horticulturae* 78:437-442.
- Sampayo-Maldonado, S., C.R. Castillo-Martínez, M. Jiménez-Casas, V. Sánchez-Monsalvo, J. Jasso-Mata, y J. López-Upton. 2017. Germinación *in vitro* de semillas de *Cedrela odorata* L. de genotipos extintos. *AgroProductividad* 10(8):53-58.
- SAS Institute. 2018. SAS User's Guide: Statistics, versión 9.4. SAS Institute, Cary, North Caroline, USA.
- Schenk, R.U., and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50(1):199-204.
- Sigarroa-Rieche, A.K., y C.L. García-Delgado. 2011. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth.) variedad sin espinas, mediante ápices meristemáticos. *Acta Agronómica* 60(4):347-354.
- Vaca, I., y P. Landázuri. 2013. Evaluación de tres niveles de nitrógeno en medio de cultivo, en las fases de enraizamiento *in vitro* y adaptación a sustrato de *Rubus glaucus* (Benth). *La Granja. Revista de Ciencias de la Vida* 18(2):48-54.
- Villa, F., A. Gomes, L. Salles, e M. Pasqual. 2005. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'Ebano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. *Ciência e Agrotecnologia* 29(3):582-589.
- Zarei, A., J. Erfani-Moghadam, and M. Mozaffari. 2017. Phylogenetic analysis among some pome fruit trees of Rosaceae family using RAPD markers. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 31(2):289-298.