

# Propagación *in vitro* de materiales seleccionados de *Rubus glaucus* Benth (mora de Castilla) en la provincia de Pamplona, región nororiental de Colombia

## Propagation *in vitro* of selected materials of *Rubus glaucus* Benth (mora de Castilla) in the province of Pamplona, northeastern Colombia

Giovanni Orlando Cancino-Escalante\*, Enrique Quevedo García\*\*, Carmen Edilia Villamizar\*\*\*, Claudia Díaz Carvajal\*\*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54262

### Resumen

En este estudio los materiales fueron seleccionados en 53 fincas pertenecientes a cuatro asociaciones de cultivadores de mora en los municipios de Pamplona y Chitagá (Norte de Santander, Colombia). Se emplearon como explantes segmentos nodales, los cuales permitieron obtener en poco tiempo brotes adventicios adecuados para la multiplicación masiva. Para la etapa de establecimiento se empleó el medio de cultivo Murashige y Skoog, (MS 1962), suplementado con ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) (0,0-0,1 mg/L) y 6-benzil aminopurina (BAP) (0,0-2,0 mg/L), en la etapa de multiplicación MS, suplementado con GA<sub>3</sub> (0,0-0,03 mg/L<sup>-1</sup>) y BAP (0,0-2,5 mg/L) y para la etapa de enraizamiento MS, suplementados con ácido indolbutírico (AIB) (0,0-1,0 mg/L). A los datos generados en las tres etapas, se les aplicó un diseño experimental de bloques completos al azar y se analizaron estadísticamente los promedios de los tratamientos mediante una prueba de Tukey. Los resultados alcanzados indicaron tasas promedio de contaminación (16,5-49,7 %) multiplicación (3,8-4,3 brotes/explante) y enraizamiento (3,3-4,3 raíces/planta) *in vitro* para los diferentes materiales seleccionados y evaluados. Estos resultados, logrados por primera vez en la región Nororiental de Colombia, son importantes por cuanto se contara con materiales seleccionados disponibles para los cultivadores de mora de la región.

**Palabras clave:** Mora de los Andes, micropropagación, asociaciones de cultivadores, 6-benzil aminopurina.

### Abstract

In this study plant materials were selected in 53 farms belonging to four growers associations of blackberry in the municipalities of Pamplona and Chitagá (North of de Santander, Colombia). Nodal segments were used as initial explants of *R. glaucus*. For the establishment stage Murashige and Skoog, 1962 (MS) media was used and, supplemented with of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) (0.0 -0.1 mg/L) and 6-aminopurine (BAP) (0.0 -2.0 mg/L); for the multiplication stage MS was supplemented with GA<sub>3</sub> (0.0 -0.03 mg/L) and BAP, (0.0 -2.5 mg/L) and for the rooting stage MS was supplemented with acid indolbutirico (0.0 -1.0 mg/L). From the data generated during the three stages, an experimental design of incomplete blocks was randomly applied and the treatments averages were statistically analyzed using the Tukey Test. The results indicated average rates of contamination (16.5-49.7 %), multiplication (3.8-4.3 shoots/explant) and *in vitro* rooting (3.3-4.3 roots/plant) for the different evaluated materials. These results, achieved first in the Northeastern region of Colombia, are important in that they will feature selected materials available for blackberry growers in the region.

**Key words:** Andean blackberry, micropropagation, growers associations, 6-aminopurine.

**Recibido:** octubre 15 de 2014

**Aprobado:** septiembre 2 de 2015

- \* Profesor Asociado PhD. Universidad de Pamplona - Facultad de ciencias básicas – Departamento de Biología. Km 1 vía Bucaramanga el Buque, Pamplona, Norte de Santander, Colombia. gcancino@unipamplona.edu.co
- \*\* Profesor Asociado MSc. Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Agrarias - Departamento de Agronomía. km 1 vía Bucaramanga el Buque, Pamplona, Norte de Santander, Colombia. enriquegarcia@unipamplona.edu.co
- \*\*\* Profesor MSc. Universidad de Pamplona, Facultad de Educación. km 1 vía Bucaramanga el Buque, Pamplona, Norte de Santander, Colombia. cevill28@gmail.com.
- \*\*\*\* MSc Universidad de Pamplona - Facultad de ciencias básicas – Departamento de Biología. Km 1 vía Bucaramanga el Buque, Pamplona, Norte de Santander, Colombia. gcancino@unipamplona.edu.co

## Introducción

El género *Rubus* es uno de los más diversos en términos morfológicos y genéticos. Presenta un amplio espectro de especies silvestres y las cultivadas son apetecidas por sus frutos comestibles (Jennings, 1988). Los frutos son consumidos frescos o procesados y actualmente existe gran interés por sus propiedades medicinales debido a su alta actividad antioxidante (Seeram *et al.*, 2006, Cusba Mejía 2011).

La especie de *Rubus* que actualmente se cultiva comercialmente de manera masiva en Suramérica es *R. glaucus* Benth. Esta especie se distribuye ampliamente en el país, desde el departamento del Putumayo hasta el Valle del Magdalena y se cultiva en altitudes entre 2 000 y 3200 m s.n.m. Según datos del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y el Departamento Administrativo de Estadística (DANE) para noviembre de 2013, Colombia contaba con 7 007 hectáreas plantadas, de las cuales 4 922 están en edad productiva y una producción de 73 856 toneladas anuales. Adicionalmente los departamentos de Cundinamarca, Santander, Norte de Santander y Antioquia, son los que presentan los mayores porcentajes en área y producción (DANE, 2013).

A pesar del gran potencial de la mora en el mercado internacional, su propagación se hace vegetativamente en Colombia a partir de materiales no identificados como élite; productores y viveros propagan los materiales regionales sin normas de calidad fisiológica y sanitaria ni ofrecen seguridad de la identidad genética del material (Castro & Díaz, 2001; Castro, Díaz, Montoya & Ríos, 2006).

En este contexto, el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* o micropropagación se constituye en una herramienta práctica que permite superar estas limitaciones. Adicionalmente, es una técnica rápida en especies frutales y puede producir masivamente individuos de *Rubus* genéticamente idénticos y libres de virus en un espacio reducido, sin ser afectados por las variaciones ambientales (Zimmerman, 1991; Sobczykiewicz, 1992).

A nivel mundial se han publicado varios trabajos de cultivo *in vitro* de diferentes especies de *Rubus*. El primer trabajo de propagación *in vitro* de *Rubus* fue desarrollado por Broome y Zimmerman (1978) en los cultivares *thornless* y *harper* de mora. Posteriormente las investigaciones se han centrado en los factores que influyen en la respuesta *in vitro* como son la desinfección de los explantes y las bajas tasas de propagación (McPheeters, Skirvin & Hall 1988; Tian, Duan & Wang, 2005; Wu, Miller, Hall & Mooney, 2009, Clark & Finn, 2011). Igualmente se destacan experimentos que se focalizan en la micropropagación de nuevos cultivares y en los existentes (Donnelly & Daubeny 1986; Bobrowski, Mello Farias & Peters, 1996; González *et al.*, 2000; Zawadzka & Orlikowska, 2006). En Colombia, Marulanda y Márquez (2002), obtuvieron plantas mediante organogénesis, procedentes de la zona cafetera

colombiana; Castro y Díaz (2001) por su parte han desarrollado metodologías para la micropropagación de mora de material seleccionado. Adicionalmente, Valderrama *et al.*, 2009 publicaron la validación y escalonamiento de plántulas de mora *in vitro* y manejo *ex vitro* para entrega a agricultores de Silvanía, Cundinamarca. Igualmente se destaca las investigaciones de Sigarro y García (2011), quienes evaluaron la micropropagación en *R. glaucus* sin espinas. Sin embargo a pesar de las diferentes investigaciones a través de los años un gran número de cultivares son todavía recalcitrantes al cultivo de tejidos. Entre los factores críticos que influyen en la respuesta *in vitro* se encuentran la desinfección del explante y la baja tasa de propagación (Daubeny, 1986, MCPheeters *et al.*, 1988; Donnelly y Daubeny, 1986 y Bobrowski *et al.*, 1996; González, López, Valdés y Ordas, 2000; Tian *et al.*, 2005, Zawadzka y Orlikowska, 2006, Clark y Finn, 2011).

En consecuencia el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la micropropagación de materiales seleccionados de *R. glaucus* de ocho fincas comerciales en los municipios de Pamplona y Chitagá los cuales habían sido caracterizados tanto agrónomicamente como molecularmente (Cancino, Quevedo, Villamizar, Sánchez y Díaz, 2014).

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Entre marzo de 2009 y noviembre de 2011 se efectuaron salidas de campo para la recolección de muestras *R. glaucus* en 53 fincas de cuatro asociaciones de cultivadores de mora de los municipios de Pamplona y Chitagá. De acuerdo con los resultados de encuestas a agricultores y características agronómicas, se seleccionaron 8 fincas en las cuales se encontraban los mejores materiales de las cuatro asociaciones (figura 1, tabla 2). Para la evaluación de micropropagación se seleccionó un material por finca para un total de ocho materiales. Previamente estos materiales habían sido caracterizados agronómica y molecularmente (Cancino *et al.*, 2011, 2014). Las fincas se localizan en 14 veredas de los municipios de Pamplona y Chitagá, entre 7°7',60" y 7°28',15" norte y 72°35',16" y 72°42',43" Oeste (figura 1). Todas las fincas poseen cultivos comerciales de *R. glaucus*, mora de Castilla con espinas (CE) y sin espinas (SE) rodeados de bosques secundarios y matorrales a altitudes entre los 2 070 y 2 860 m s.n.m.

### Establecimiento *in vitro*

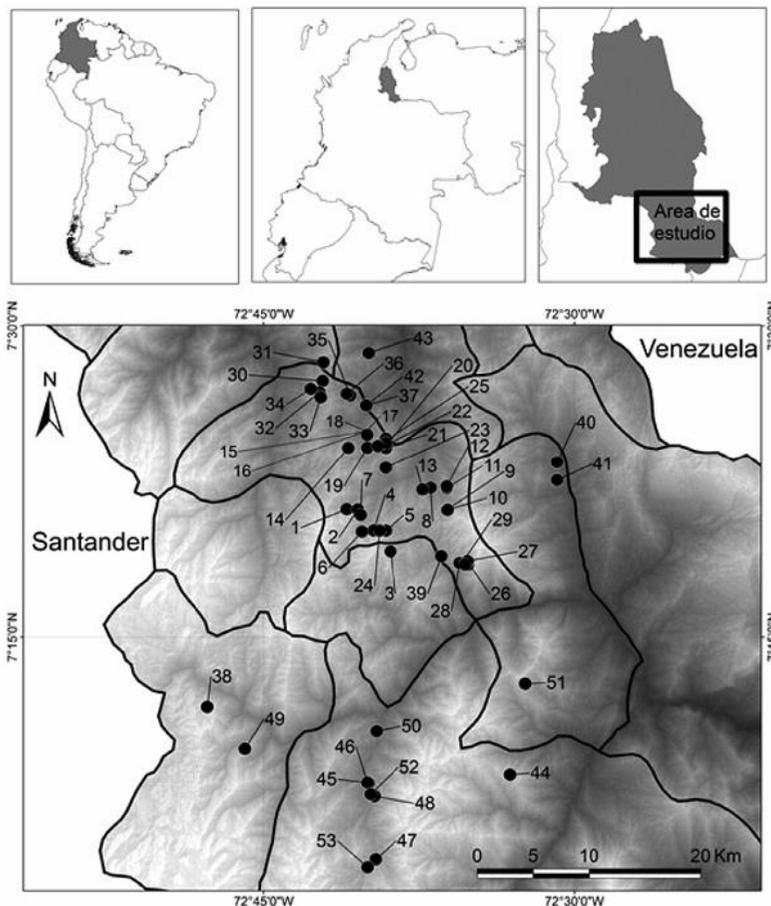
Para el establecimiento *in vitro* de explantes del material seleccionado en las diferentes fincas se efectuaron nuevamente salidas de campo en cada uno de los predios. Se recolectaron segmentos de tallo de ramas jóvenes de 50 cm de longitud y se llevaron en vueltas

en papel periódico, al laboratorio de cultivos vegetales *in vitro* de la Universidad de Pamplona. Las ramas fueron cortadas hasta obtener segmentos nodales (microestacas) de 3-5 cm de longitud aproximadamente con una yema axilar; los explantes fueron lavados en una solución jabonosa; posteriormente, se sometieron a dos tratamientos de desinfección superficial (tabla 1). Finalizados los tiempos de desinfección superficial, se efectuaron 5 enjuagues en los explantes, con agua destilada estéril y se colocaron en una solución de ácido cítrico 150 mg/L para controlar la oxidación, mientras se procedía a su siembra. Los explantes desinfectados se cortaron nuevamente hasta obtener un explante (microestaca con yema axilar) de 2 cm de longitud. Cada explante, fue colocado en el medio de establecimiento MS suplementado, con concentraciones de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) y 6-benzil aminopurina (BAP). Al cabo de una semana se tomaron los ápices meristemáticos que emergieron de cada microestaca libres de cualquier contaminación y se transfirieron a medio fresco con el fin de garantizar un rápido establecimiento de los explantes y 30% de sacarosa. Los medios con un pH ajustado de 5,8 se esterilizaron con autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión y

121°C. Para la solidificación de los medios se utilizó agar bacteriológico al 7%. Posteriormente, al cabo de 20 días de incubación a una temperatura de 20±2°C, fotoperiodo de 16 horas luz/8horas de oscuridad y una intensidad lumínica de 2000 lux, se descartaron los explantes contaminados y dejaron por 20 días más los explantes sin contaminación. El establecimiento de los explantes se realizó bajo condiciones de estricta asepsia utilizando para ello una cámara de flujo laminar previamente acondicionada. Los explantes fueron establecidos en frascos de compota con 20 ml de medio de cultivo semisólido.

**Tabla 1.** Tratamientos de desinfección superficial evaluados

Componente	T1	T2
	Minutos (m)	Segundos (S)
Isodine® espuma 2%.	10 m	10 m
Fungicida Mertec® 0,4%	30 m	60 m
Alcohol 70%	30 s	60 s



**Figura 1.** Área de estudio. Municipios de Pamplona y Chitagá, Norte de Santander, Colombia. Ubicación de las fincas (53) donde se recolectaron las muestras de *R. glaucus* Benth.

**Tabla 2.** Materiales seleccionados de las ocho fincas de este estudio en el municipio de Pamplona.

Número	Código	Finca	Vereda	m s.n.m <sup>3</sup>
1	PCHA03 SE <sup>1</sup>	Arrayan	Chíchira	2.328
2	PRH305 SE	Higuerón	El Rosal	2.745
3	PCV3016 SE	La Victoria	Cimitarigua	2.585
4	PSS SE	Salado	San Francisco	2.293
5	PSAG002 CE <sup>2</sup>	La Gonzalera	Sabaneta alta	2.585
6	PSAG010CE	La Gonzalera	Sabaneta alta	2.585
7	PSAG011CE	La Gonzalera	Sabaneta alta	2.585
8	PCV102CE	La Victoria	Cimitarigua	2.585

<sup>1</sup> S.E. *R. glaucus* Benth sin espinas. <sup>2</sup> C.E. *R. glaucus* Benth con espinas. <sup>3</sup> m s.n.m metros sobre el nivel del mar.

Hipoclorito sodio 2%	10 m	10 m
Hipoclorito sodio 3%		

### Multiplicación *in vitro*

Los explantes sanos y libres de contaminantes se dividieron y se transfirieron al medio de multiplicación MS, suplementados con concentraciones de (GA<sub>3</sub>) y (BAP), (tabla 3, medios M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>5</sub> y M<sub>6</sub>) y 30% de sacarosa. Luego de cuatro semanas de crecimiento se dividieron los explantes nuevos y se transfirieron a un medio fresco de multiplicación hasta obtener el número de explantes para cada genotipo evaluado.

### Enraizamiento *in vitro*

Los explantes multiplicados se dividieron, se sembraron en el medio de enraizamiento MS suplementados con ácido indolbutírico (tabla 3, medios M<sub>8</sub> y M<sub>9</sub>) y 30% de sacarosa. Los explantes se incubaron durante cuatro semanas a las mismas condiciones de temperatura, fotoperiodo e intensidad lumínica establecidas en la etapa de establecimiento y multiplicación.

### Diseño experimental y análisis de datos

Se realizó un diseño de bloques completos al azar, con arreglo factorial 9 x 3. Este arreglo significó nueve medios con tres concentraciones hormonales (en

**Tabla 3.** Efecto del BAP, GA<sub>3</sub> e IBA en las etapas de propagación *in vitro* de materiales seleccionados de *R. glaucus* Benth

Etapas	Reguladores del crecimiento		
	Bencil amino purina	Ácido giberélico	Ácido indol butírico
Establecimiento	(BAP mg/L)	(GA <sub>3</sub> mg/L)	(IBA mg/L )
M <sub>1</sub>	0,0	0,0	0,0
M <sub>2</sub>	1,0	0,5	0,0
M <sub>3</sub>	2,0	1,0	0,0
Multiplicación			
M <sub>4</sub>	0,0	0,0	0,0
M <sub>5</sub>	2,5	0,03	0,0
M <sub>6</sub>	2,5	0,05	0,0
Enraizamiento			
M <sub>7</sub>	0,0	0,0	0,0
M <sub>8</sub>	0,0	0,0	1,0
M <sub>9</sub>	0,0	0,0	2,0

cada etapa) en MS para cada uno de los diferentes materiales de *R. glaucus* Benth evaluados para un total de veinte y siete tratamientos. Cada tratamiento tuvo 5 repeticiones, en donde cada replica estaba representada por un frasco de cultivo con un explante. Se realizó una análisis de varianza (ANDEVA), posteriormente se hizo una comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia de 5% para determinar cuáles de los tratamientos presentaban diferencias estadísticas significativas. Los datos fueron colectados durante 8 semanas. Se empleó el programa estadístico SPSS versión 19. Se realizaron análisis estadísticos de los datos para obtener el valor promedio y valores de dispersión. Asimismo, se realizó un análisis de varianza y en caso de existir diferencias estadísticas entre localidades se realizó la prueba Tukey de separación de medias. El modelo estadístico para realizar el ANDEVA fue completamente al azar con efecto anidado o jerárquico (Dytham, 2012).

## Resultados y discusión

### Efecto de los tratamientos de desinfección en los materiales de las ocho fincas evaluadas en el estudio

Se presentaron diferencias significativas a un nivel del 5% ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos  $T_1$  y  $T_2$  de desinfección (figura 2). En el tratamiento  $T_1$  se observó una mayor contaminación en los materiales de las ocho fincas evaluadas. Debido a que los explantes fueron expuestos a menores tiempos con los agentes desinfectantes que con el tratamiento  $T_2$ . Sin embargo en el tratamiento  $T_2$  se presentó mayor oxidación. Por otra parte se observó que los genotipos de *R. glaucus* sin espinas presentaron menores porcentajes de contaminación que los genotipos con espinas. Posiblemente la presencia de las espinas favorece que diversos tipos de contaminantes permanezcan en los explantes incrementando la contaminación superficial. Los resultados contrastan con los observados por Valderrama *et al.*, 2009 quienes registraron porcentajes entre 28 y

57% en *R. glaucus* SE. En este contexto es importante indicar que la selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección se determinan en gran medida por las características del explante, y se establecen experimentalmente por ensayo y error (Pedraza-Manrique, 2008). El porcentaje de contaminación y por ende el de supervivencia de los explantes está fuertemente influenciado por varios factores como son: la época del año, el estado fisiológico de la planta, las condiciones ambientales y la morfología del explante. En el presente estudio, los materiales fueron recolectados en la época seca (meses de diciembre-marzo, junio-agosto) lo cual favoreció los bajos índices de contaminación. Por el contrario la recolección de los explantes por parte de Valderrama, Álvarez, Barro, Robayo y Nuñez (2009) fue efectuada en diferentes épocas del año lo cual posiblemente determino niveles mayores de contaminación en los materiales del estudio de estos investigadores. Es importante señalar que lo más recomendable para el establecimiento de plantas *in vitro* es el empleo de explantes proveniente de plantas mantenidas en condiciones de invernadero, a las cuales se les debe realizar desinfección con fungicidas y bactericidas. Sin embargo, para el presente estudio no fue posible contar con plantas mantenidas en condiciones de invernadero. En lo que respecta a la fenolización u oxidación de los explantes con los dos tratamientos de desinfección en las microestacas se evidencio mayor oxidación en todos los materiales con el tratamiento  $T_2$  con respecto a  $T_1$ . Es importante destacar que el subcultivo de las yemas adventicias de las microestacas luego de una semana de cultivo permitió reducir la contaminación endógena hasta un nivel mínimo, sin necesidad de emplear procedimientos fuertes para la desinfección del material vegetal.

### Efecto de los medios de cultivo $M_1$ , $M_2$ y $M_3$ sobre la longitud y numero de hojas en la fase de establecimiento en yemas meristemáticas de *R. glaucus* Benth

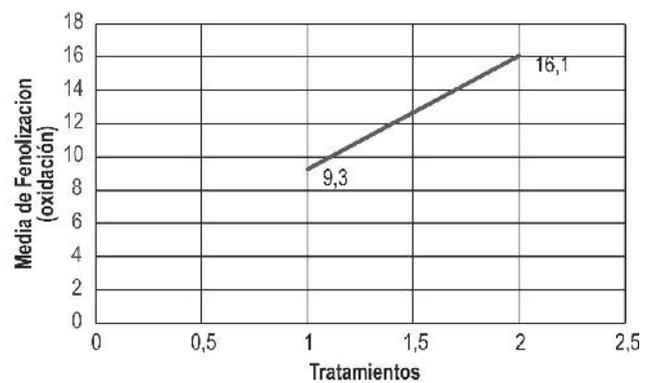
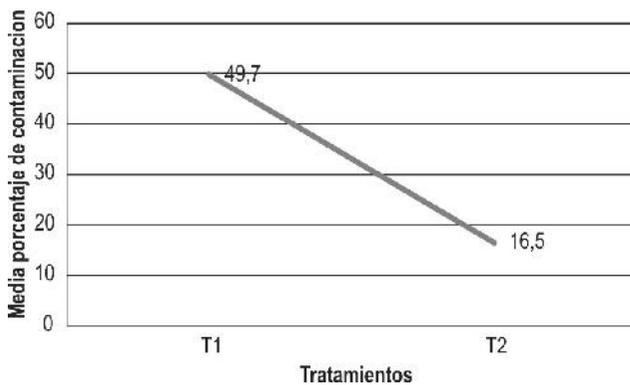


Figura 2. Efecto de los tratamientos de desinfección de los materiales *R. glaucus* Benth.

El efecto de los medios de cultivo sobre el desarrollo de los explantes durante la fase de establecimiento en los ocho materiales se observa en la tabla 4. Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ), en número de hojas entre medios de cultivo, observándose un mayor crecimiento y desarrollo de ápices meristemáticos en el medio M3 lo que permitió una mejor formación de plántulas previo al inicio de la fase de multiplicación. Varios autores Muñoz y Reyes (2006), Sigarroa y García (2011), han observado que en el cultivo de meristemas de *R. glaucus* Benth la utilización de AG<sub>3</sub> presenta los mejores desarrollos cuando se aplica en combinación con BAP. Tanto el número de hojas como el crecimiento en longitud fueron altos en relación a los otros tratamientos (17,8 hojas y 1,41 cm respectivamente) (tabla 4).

**Tabla 4.** Prueba de comparación múltiple de Tukey el efecto de los medios de cultivo sobre el número de hojas en la fase de establecimiento en yemas meristemáticas de *R. glaucus* Benth de ocho materiales evaluados.

Tratamiento	No de hojas		Porcentaje supervivencia
M <sub>3</sub>	14,538	a	82,2
M <sub>2</sub>	8,375	b	71,3
M <sub>1</sub>	2,975	c	65,3

Valores seguidos con diferente letra son significativamente diferentes con  $P < 0,05$ , usando la prueba de rango múltiple de Tukey.

### Multiplicación de los brotes

Luego de cuatro semanas de establecidos los explantes en los medios de multiplicación se obtuvieron plantas en el medio M<sub>5</sub> en el cual alcanzaron mayores longitudes y números de brotes que los medio M<sub>4</sub> y M<sub>6</sub> ( $P < 0,05$ ) (tabla 5). Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0,05$ ) para las variables crecimiento promedio y número de brotes (tabla 5). Se observaron mejores resultados en el medio M<sub>5</sub> debido a una menor concentración de GA<sub>3</sub> y que en el medio M<sub>6</sub> e igual concentración de BAP. Es importante resaltar que el número de brotes obtenidos en todos

**Tabla 5.** Prueba de comparación múltiple de Tukey del efecto de los medios de cultivo sobre el crecimiento promedio y el número de brotes en la fase de multiplicación en yemas meristemáticas de *R. glaucus* Benth de ocho materiales evaluados.

Tratamiento	Crecimiento promedio		Medio de cultivo	Numero de brotes		Porcentaje supervivencia
M <sub>5</sub>	2,156	a	M <sub>5</sub>	1,800	a	74,3
M <sub>4</sub>	1,188	b	M <sub>6</sub>	1,513	b	69,3
M <sub>6</sub>	1,075	b	M <sub>4</sub>	0,813	b	63,6

Valores seguidos con diferente letra son significativamente diferentes con  $P < 0,05$ , usando la prueba de rango múltiple de Tukey.

los materiales evaluados fueron menores a lo descrito por Sigarroa y García (2011) (7,5), Villa, Gómez, Salles y Pascual (2009) (3,99) y Castro y Díaz 2001 (4,7). Para el caso de esta investigación es evidente que la gran diversidad de materiales de *R. glaucus* Benth SE y CE evaluados presentaron una respuesta muy heterogénea en la variable número de brotes. La diferencia en el número de brotes obtenidos puede ser el resultado de las diferencias de los diferentes genotipos evaluados.

### Enraizamiento in vitro

Los brotes se seccionaron y sembraron en el medio de enraizamiento y permanecieron por cuatro semanas hasta el desarrollo y formación de raíces. Se observaron los mejores resultados en el medio M<sub>9</sub>. El número promedio de raíces en este medio para los diferentes materiales evaluados fue muy homogéneo observándose de 4,3 a 3,3 raíces por planta a las cuatro semanas de cultivo (tabla 6). Igualmente el crecimiento en longitud de la raíces se presentó entre 4,9 y 2,1 cm. Estos resultados son similares a los obtenidos por Muñoz y Reyes (2006) en los cuales el efecto del IBA para la formación de raíces fue el mejor que el de otros reguladores como ácido indolacético (IAA) y ácido naftalenacético (ANA) para esta etapa. Los resultados alcanzados bajo este estudio son similares a los descritos por Castro *et al.*, (2006), quienes realizaron estudios de enraizamiento en diferentes especies de *Rubus* bajo la aplicación de ácido indolbutírico (IBA) en diferentes concentraciones, encontrándose que en concentraciones de IBA entre 1 y 3 mg/L inducen un porcentaje de enraizamiento del 100%. Igualmente Muñoz y Reyes (2006), indican una respuesta similar al anterior estudio es así ya que con 1,0 mg/L de IBA se obtienen plantas con mayor número de raíces y con 100% de plantas enraizadas.

### Conclusiones

El empleo de microestacas con yema axilar es una eficiente metodología para iniciar un proceso de micropropagación (figura 3) en diferentes genotipos de *R. glaucus* Benth, facilitando la obtención de plántulas libres de contaminantes para las siguientes fases del

**Tabla 6.** Comparación de medias de Tukey de los medios de cultivo M<sub>7</sub>, M<sub>8</sub> y M<sub>9</sub> en la fase de enraizamiento de segmentos nodales de *R. glaucus* en materiales provenientes de ocho finca

Medio de cultivo	Longitud de la raíz		Medio de cultivo	No Raíces/Planta		Porcentaje supervivencia
M <sub>9</sub>	3,675	a	M <sub>9</sub>	3,713	a	81,3
M <sub>7</sub>	2,313	b	M <sub>7</sub>	2,263	b	74,4
M <sub>8</sub>	1,813	b	M <sub>8</sub>	1,800	b	71,5

Valores seguidos con diferente letra son significativamente diferentes con P<0,05, usando la prueba de rango múltiple de Tukey.

proceso de micropropagación. Los mejores resultados observados para las fases de establecimiento y multiplicación de los ocho genotipos de *R. glaucus* Benth evaluados fueron M<sub>3</sub> (6 benzilaminopurina 6BAP 2,0 mg/L, Acido giberélico GA<sub>3</sub> 1,0 mg/L) y M<sub>5</sub> (6BAP 2,5 mg/L GA<sub>3</sub> 0,03 mg/L) respectivamente. Favoreciendo progresivamente la longitud, el desarrollo foliar y el número de brotes. La aplicación de ácido indolbutírico (IBA) 2,0 mg/L favorece el desarrollo radicular en los diferentes genotipos de *R. glaucus* Benth evaluados. Los ocho genotipos evaluados respondieron adecuadamente a la metodología desarrollada bajo este estudio lo cual la hace promisoría y apropiada para propagar masivamente estos materiales en la región de Pamplona y Chitagá (Norte de Santander, Colombia).

### Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a la Universidad de Pamplona, al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Territorial (proyecto 2008L72264-7141), a las asociaciones de cultivadores de mora de Pamplona y Chitagá (Aspagro, Aprochit, Sanfrimora y Aspri).

### Financiación

El presente trabajo fue financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Territorial y la Universidad de Pamplona, en Alianza con las Asociaciones de Cultivadores de Mora de los municipios de Pamplona y Chitagá (Norte de Santander, Colombia. Proyecto: Caracterización molecular de especies de mora (*Rubus* sp.) cultivadas y multiplicación clonal de accesiones promisorias con características de alta productividad y tolerancia a enfermedades código 2008L72264-7141. 2009-2011.

### Referencias

Bobrowski, V., Mello Farias, P., & Peters, J. (1996). Micropropagation of blackberries (*Rubus* sp.) cultivars. *Revista Brasileira de Agrociencia*, 2 (1), 17-20.

Broome, O., & Zimmerman, R. (1978). *In vitro* propagation of blackberry. *HortScience*, 13, 151-153.

Cancino Escalante, G., Sánchez-Montaño, L., Quevedo García, E., & Díaz Carvajal, C. (2011). Caracterización fenotípica de accesiones de especies de *Rubus* de los municipios de Pamplona

y Chitagá, región nororiental de Colombia. *Universitas Scientiarum*, 16 (3), 219-233.

Cancino Escalante, G., Quevedo-García, E., Villamizar, C., Sánchez Montaño, L., & Díaz Carvajal, C. (2014). Selección de materiales promisorios de mora (*R. glaucus* Benth) en los municipios de Pamplona y Chitagá, región Nororiental de Colombia. *Bistua*, 12 (1), 93-114.

Castro, D., & Díaz, J. (2001). Alternativas para el manejo integrado del cultivo de la mora de Castilla (*R. glaucus* Benth). Medellín, Colombia. Universidad Católica de Oriente, Unidad de Biotecnología Vegetal.

Castro, D., Díaz, J., Montoya, J., & Ríos, D. (2006). Micropropagación de especies de interés hortícola y forestal en bioreactores de inmersión temporal. *Revista Universidad Católica De Oriente*, 1, 63-71.

Clark, J., & Finn, Ch. (2011). *Blackberry Breeding and Genetics*. Recuperado de [http://www.globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/Sample/FVCSB\\_5%28S11%2927-43o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/Sample/FVCSB_5%28S11%2927-43o.pdf).

Cusba Mejía, M. (2011). Contribución al estudio de la huella genómica de genotipos élite de mora (*R. glaucus* Benth.) mediante marcadores SSRs. (Tesis de pregrado). Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia.

DANE, (Departamento Nacional de Estadística). (2013). El cultivo de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) frutal de clima frío moderado, con propiedades curativas para la salud humana. Recuperado en [http://www.dane.gov.co/files/.../insumos\\_factores\\_de\\_produccion\\_nov\\_2013.pdf](http://www.dane.gov.co/files/.../insumos_factores_de_produccion_nov_2013.pdf).

Donnelly, D., & Daubeny, H. (1986). Tissue culture of *Rubus* species. *Acta Horticulturae*, 183, 305-314.

Dytham, C. (2011). Choosing and Using Statistics. *A Biologist's Guide*. Oxford. Editorial: Willey-Blackwell.

González, M., López, M., Valdes, A., & Ordas, R. (2000). Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. *Annals of Applied Biology*, 137, 73-78.

Jennings, D. (1988). Raspberries and blackberries: their breeding, diseases and growth. London. Academic Press.

Marulanda, M., & Márquez, M. (2002). Evaluación de la estabilidad genética de vitroplantas de *Rubus glaucus* Benth mediante marcadores moleculares RAPD. *Actualidades Biológicas*, 24, 31-36.

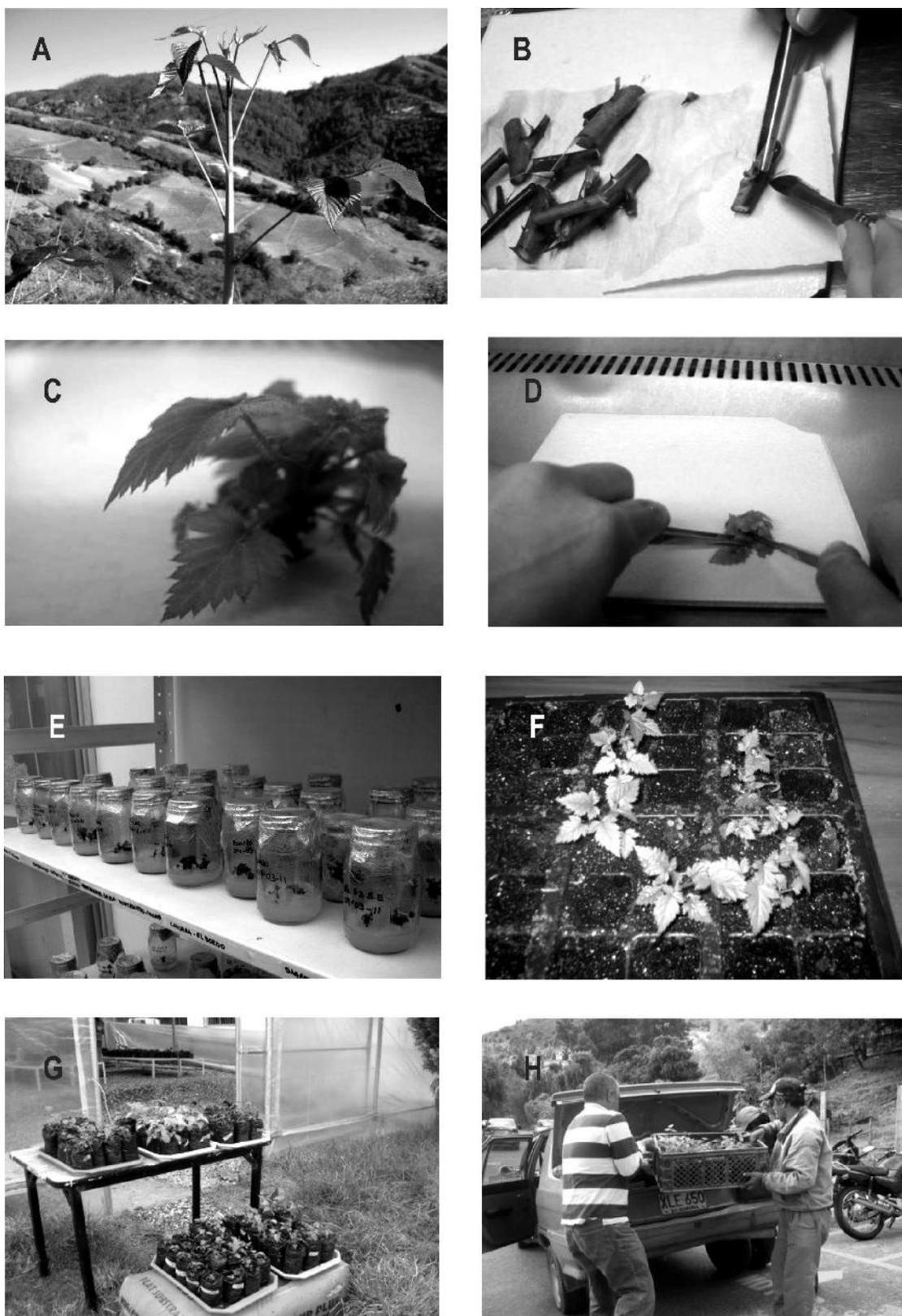
McPheeters, K., Skirvin, R., & Hall, H. (1988). Brambles (*Rubus* spp.). *Biotechnology in agriculture*. London. Bajaj YPS.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 437-497.

Muñoz, I., & Reyes, H. (2006). Efecto de reguladores de crecimiento, l-cisteína y ácido ascórbico en el cultivo *in vitro* de mora de castilla (*R. glaucus* Benth). (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua. Recuperado de <http://cenida.una.edu.ni/Tesis/tnf01m967.pdf>.

Pedraza-Manrique, J. (2008). Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en condiciones *in vitro*. Bogotá, Colombia. Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

Seeram, N., Adams, L., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H., & Heber, D. (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry,



**Figura 3.** Proceso de micropropagación de materiales seleccionados de *Rubus glaucus* Benth. **A.** Segmentos de tallo plantas seleccionadas. **B.** Corte de los segmentos de tallo a propagar en el laboratorio. **C.** Brotes obtenidos a las 4 semanas de siembra. **D.** Corte y selección de brotes. **E.** Desarrollo y elongación brotes *in vitro*. **F.** Establecimiento a condiciones *ex-vitro*. **G.** Materiales acondicionados en el invernadero. **H.** Entrega de los materiales micropropagados a los agricultores.

- cranberry red raspberry and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cell *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9329-9339.
- Sigarroa, A., & García, D. (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.
- Sobczykiewicz, D. (1992). Micropropagation of raspberry (*Rubus idaeus* L.). En *high-tech and micropropagation*, (pp. 80-89). London: Bajaj YPS (ed.), Biotechnology in agriculture and forestry, II. Springer.
- Tian, Y., Duan, X., & Wang, F. (2005). The effect of season on rapid propagation of raspberry. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 28, 18-21.
- Valderrama, A., Álvarez, R., Barrero, L., Robayo, M., & Núñez, V. (2009). Validación y escalamiento de plántulas de mora *in vitro* y manejo *ex vitro* para entrega a agricultores de Sylvania. En L. Barrero Meneses, Corpoica - Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (Ed.), *Caracterización, evaluación y producción de material limpio de mora con alto valor agregado*. Pp. 64 - 75. Bogotá.
- Villa, F., Gomez, A., Salles, L., & Pascual, M. (2005). Multiplicação *In vitro* da amoreira-preta 'Ebano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. *Ciência e Agrotecnologia*, 29 (3), 582 - 589.
- Wu, J., Miller, S., Hall, H., & Mooney, P. (2009). Factors affecting the efficiency of micropropagation from lateral buds and shoot tips of *Rubus*. *Plant Cell Tissues and Organ Culture*, 99, 17-25.
- Zawadzka, M., & Orlikowska, T. (2006). Increase in the quality of raspberry cultures under the influence of FeEDDTA. *Acta Horticulturae*, 725, 161-164.
- Zimmerman, R. (1991). Micropropagation of temperate zone fruit and nut crops. En *Micropropagation*, Debergh PC, Zimmerman RH (Ed.), Kluwer. Pp. 231-246. The Netherlands.
- Zimmerman, R., & Galletta, O. (1980). Propagation of thornless blackberries by one cuttings. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 105(3), 405-407.