

Establecimiento y ensayos preliminares de propagación *in vitro* de zarzamora silvestre (*Rubus sp.*) del Centro Poblado San Salvador, región Amazonas

Establishment and preliminary tests of *in vitro* propagation of wild blackberry (*Rubus sp.*) From the San Salvador Town Center, Amazonas region

Carlos E. Millones Chanamé¹

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de desarrollar un protocolo para el establecimiento y ensayos preliminares de propagación *in vitro* de zarzamora silvestre (*Rubus sp.*) con potencial agroindustrial proveniente del Centro Poblado San Salvador, región Amazonas. Se identificaron plantas de zarzamora silvestre que tenían parámetros de interés agroindustrial, y a partir de estas plantas se evaluó soluciones desinfectantes para el establecimiento de yemas axilares, posteriormente se evaluó diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento giberelinas, auxinas y citocininas para optimizar la propagación *in vitro* de zarzamora silvestre. Los resultados mostraron que el empleo de AG3 0,1 mg/L más kinetina 0,04 mg/L fueron las concentraciones adecuadas para el crecimiento y desarrollo de yemas axilares de zarzamora silvestre. Asimismo, el empleo de 1 o 2 mg/L de AIB en el medio de cultivo de enraizamiento, se obtuvo el mayor número de raíces y porcentaje de inducción de raíces adventicias en los brotes, resultados que permitirán tener un protocolo para la propagación vegetativa de esta especie silvestre de importancia económica.

Palabras clave: Zarzamora silvestre, *Rubus sp.*, ácido giberélico, ácido indol-3-butírico.

ABSTRACT

The present investigation was carried out aiming to developed a protocol for the establishment and preliminary tests of *in vitro* propagation of wild blackberry (*Rubus sp.*) with agro-industrial potential coming from the San Salvador Village Center, Amazonas region. Wild blackberry plants that had parameters of agro-industrial interest will be identified, and from these plants, disinfectant solutions for the establishment of axillary buds were evaluated, subsequently different concentrations of gibberellins, auxin and cytokinin growth regulators were evaluated to optimize the *in vitro* propagation of wild blackberry. The results showed that the use of AG3 0,1 mg/L more kinetin 0,04 mg/L were the appropriate concentrations for the growth and development of axillary buds of wild blackberry. Also, the use of 1 or 2 mg/L of AIB in the rooting culture medium, obtained the highest number of roots and percentage of induction of adventitious roots in the shoots, results that will allow to have a protocol for the vegetative propagation of this wild species of economic importance.

Keywords: Wild blackberry, *Rubus sp.*, gibberellic acid, indole-3-butyric acid.

¹ Dr. en Genética y Mejoramiento de Plantas, Profesor Principal, Facultad de Ingeniería de Sistemas y Mecánica Eléctrica (FISME)Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, correo electrónico: carlos.millones@untrm.edu.pe

I. INTRODUCCIÓN

El género *Rubus* es uno de los géneros más diversos tanto morfológico como genéticamente; posee un amplio número de especies silvestres comparados con aquellos cultivares domesticados que han sido mejorados para fruto comestible (Wu et al., 2009). La especie *Rubus glaucus* se encuentra distribuida desde México hasta Ecuador, y es cultivada en los andes suramericanos, y se considera un cultivo nativo en Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Panamá y Perú (Ruiz y Sepúlveda, 2016)

El fruto de zarzamora silvestre (*Rubus* sp.) son consumidos tanto en fresco como procesados, y recientemente su consumo está enfocado en la salud y bienestar, debido a la alta actividad antioxidante que posee (Wu et al., 2009). La mora de castilla (*R. glaucus* Benth) se consume generalmente como fruto fresco, en la industria las moras son utilizadas para producir suplementos dietéticos, zumos, yogures, helados, jaleas entre otros. La mora de castilla es apreciada por los consumidores, no sólo por su alto valor nutricional, sino también por los beneficios para la salud física y mental, además, por el alto contenido de fibras, vitaminas y minerales esenciales (Ruiz y Sepúlveda, 2016).

Los métodos tradicionales de propagación como estaca, acodo y acodo etiolado son utilizados comercialmente para muchos genotipos, pero el éxito de propagación es mayormente dependiente de adecuadas condiciones de crecimiento de la planta y condiciones ambientales. Por otro lado, en muchos genotipos superiores el proceso de enraizamiento es lento o difícil de realizar a través de los métodos tradicionales de propagación (Wu et al., 2009). A pesar de la riqueza y el gran potencial de la zarzamora, su cultivo presenta grandes limitaciones como la carencia de semillas certificadas, la escasa introducción de nuevas variedades y problemas fitosanitarios relacionados con los sistemas de propagación asexual por acodos y estacas, que favorece la transmisión de plagas y enfermedades (Sigarroa-Rieche y García-Delgado, 2011). En tal sentido, los métodos de propagación no convencional como el cultivo de tejidos proporciona un método rápido para la propagación *in vitro* de muchas especies cultivadas y puede producir un mayor número de plantas genéticamente idénticas y libres de virus en un corto tiempo y menor espacio (Mroginski y Roca, 1991).

Varias especies del género *Rubus* han sido propagadas exitosamente por cultivo *in vitro* de tejidos, las investigaciones incluyen diferentes métodos y explantes como cultivo de ápices meristemáticos (Sigarroa-Rieche y García-Delgado,

2011; Wu et al., 2009; Bobrowski et al., 1996), y yemas axilares (Cancino-Escalante et al., 2015; Ramírez y Angarita, 1990). Asimismo, han ido probados diversos reguladores de crecimiento para la multiplicación de brotes como citocininas (Wu et al., 2009), citocininas y giberelinas (Cancino-Escalante et al., 2015), y auxinas, citocininas y giberelinas (Sigarroa-Rieche y García-Delgado, 2011; Bobrowski et al., 1996).

En las zonas altoandinas de la región Amazonas existe una variedad de especies silvestres del género *Rubus*, que sólo es cultivado en los cercos de las huertas y campos de cultivo, cuyo fruto es aprovechado industrialmente para la elaboración de licores macerados, licor de crema, yogurt y mermelada. Actualmente las empresas agroindustriales de la región Amazonas vienen teniendo dificultades en la uniformidad de la calidad de los frutos de zarzamora silvestre, que repercute en la estandarización de la calidad de los productos procesados. En un avance para la solución de esta problemática es importante identificar plantas que posean frutos con parámetros de agroindustrialización, e iniciar con la estandarización de un protocolo para el establecimiento y propagación *in vitro* de zarzamora silvestre que asegure la obtención de semilla vegetativa de buena calidad, libre de fitopatógenos y disponible durante todo el año para los productores agropecuarios de Amazonas. En tal sentido, la presente investigación desarrolló un protocolo para el establecimiento y ensayos preliminares de propagación *in vitro* de zarzamora silvestre (*Rubus* sp.) con potencial agroindustrial proveniente del Centro Poblado San Salvador, Amazonas.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

La recolección de material se inició con la identificación de plantas de zarzamora silvestre con parámetros adecuados para su agroindustrialización, determinados por la Empresa Agroindustrial Camponorte S.R.L., colectándose tallos de zarzamora silvestre con 3 a 4 yemas axilares en el Centro Poblado San Salvador, distrito de Luya, Amazonas (Tabla 1),

siendo codificadas y transportadas al Laboratorio de Biología, UNTRM para los ensayos correspondientes. En la caracterización biométrica se tomaron medidas en milímetros el diámetro polar y el diámetro ecuatorial del fruto, empleando un paquímetro de 0-150 mm, precisión 0,01 mm digital marca Messen. La toma de peso de frutos en gramos, se realizó en una balanza

electrónica de 4500 kg, precisión 0,01 g marca RADWAG.

Tabla 1. Localización de los accesos de zarzamora silvestre (*Rubus* sp.) recolectados en el Centro Poblado San Salvador, distrito de Luya, Amazonas.

Acceso de zarzamora silvestre	Localización	Altitud (m.s.n.m.)
001-Rsp-UNTRM	06°33'27,2" S 77°53'11,7" WO	2867
002-Rsp-UNTRM	06°33'27,2" S 77°53'11,7" WO	2867
003-Rsp-UNTRM	06°33'38,4" S 77°53'18,3" WO	2879
004-Rsp-UNTRM	06°33,6'16" S 77°53,3'54" WO	2885
005-Rsp-UNTRM	06°33,6'16" S 77°53,3'54" WO	2885

En la caracterización proximal se tomaron medidas de los sólidos solubles totales en °brix, siguiendo la metodología desarrollada por Vergara *et al* (2016), empleando un refractómetro 0-33 ° brix, marca Atago. Asimismo, en la determinación del porcentaje de acidez titulable se siguió la metodología desarrollada por Vergara *et al* (2016), utilizando como constante el miliequivalente del ácido málico.

Para el establecimiento de yemas axilares de zarzamora silvestre *in vitro* se formuló un medio de cultivo de establecimiento que estuvo constituido por las sales inorgánicas y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962), m-inositol, sacarosa 2,5%, ácido ascórbico 150 mg/L y phytigel 0,15%. La esterilización de todos los medios de cultivos se realizó en una autoclave vertical Marca Gemmy Industrial Corp-USA, empleando 1 atmosfera de presión y 121 °C por 15 minutos.

Las secciones de tallo de *Rubus* sp. fueron lavadas con agua, detergente antes de su ingreso al cuarto de siembra. En la cámara de flujo laminar las secciones de tallo de *Rubus* sp. se desinfectaron en alcohol 70° durante 1 minuto, luego con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio comercial (5, 10 y 15%) en diferentes periodos de exposición al desinfectante, realizando los enjuagues respectivos con agua destilada estéril. En razón de no obtener éxito en la desinfección de las yemas axilares de *Rubus*. sp con el empleo de hipoclorito de sodio, se aplicó cloruro de mercurio 0,1% por un periodo de 15 minutos. Las yemas fueron colocadas en los tubos que contenían el medio de cultivo de establecimiento, el cual posteriormente fue sellado para su posterior incubación.

Una vez establecidas las yemas axilares *in vitro* y con presencia de 3 a 4 hojas verdaderas, se procedió a colocar secciones vegetativas en medios de cultivo de propagación a base de las sales y vitaminas MS, myo-inositol 100mg/L, Sacarosa 2,5%, ácido ascórbico 150 mg/L y phytigel 0,15%, suplementado con diferentes concentraciones de giberelinas y

citocininas (Tabla 2).

Tabla 2. Reguladores de crecimiento AG3 y citocininas empleados en la propagación *in vitro* del acceso 004-Rsp-UNTRM de zarzamora silvestre (*Rubus* sp.) recolectado en el Centro Poblado San Salvador, distrito de Luya, Amazonas.

Tratamientos	AG3 (mg/L)	Citocininas (mg/L)		
		KIN	BAP	2iP
Testigo ¹	0,1	0,04	---	---
AGC1	0,1	0,1	---	---
AGC2	0,1	---	0,1	---
AGC3	0,1	---	---	0,1
AGC4	0,2	0,1	---	---
AGC5	0,2	---	0,1	---
AGC6	0,2	---	---	0,1
AGC7	0,4	0,1	---	---
AGC8	0,4	---	0,1	---
AGC9	0,4	---	---	0,1

A los 28 días de cultivo *in vitro* de los explantes, fueron evaluados con respecto a la altura de brote, número de hojas, número de brotes axilares, porcentaje de sobrevivencia, clorosis de fenolización de los explantes. La clorosis fue evaluada mediante el uso de notas, adaptadas de Accioly *et al* (2004), siendo el grado 1: ausencia de clorosis en hojas, grado 2: inicio de clorosis, grado 3: clorosis, grado 4: alta clorosis, grado 5: muy alta clorosis, y grado 6: tejido fenolizado.

Los brotes inducidos de *Rubus* sp. con 3 a 4 hojas verdaderas, se colocaron en medios de cultivo de propagación a base de las sales y vitaminas MS, myo-inositol 100mg/L, sacarosa 3%, ácido ascórbico 150 mg/L, phytigel 0,15% y carbón activado 0,3%, suplementado con diferentes concentraciones reguladores de crecimiento auxinas, giberelinas y citocininas (Tabla 3).

Los explantes fueron incubados en temperatura diurna: 26–28 °C, temperatura nocturna: 24–26 °C, irradiancia: 50 μmol/m²s⁻¹ (lámparas fluorescentes 36W tipo luz fría) y fotoperiodo: 16/8 horas (día/noche).

Para el análisis estadístico, se procesaron los datos biométricos de los frutos de zarzamora silvestre (diámetro polar, ecuatorial y peso de fruto) y el efecto de los reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* (altura de brote, número de hojas, número de brotes), empleando un Diseño Completamente al Azar (DCA), los tratamientos fueron evaluados por su significación estadística a través de un análisis de varianza (ANVA), y las medias fueron comparadas utilizando la prueba LSD y prueba de Dunnet, respectivamente, al 0,05 de nivel de significación. En

el procesamiento de datos de efecto de los reguladores de crecimiento en el enraizamiento de brotes de zarzamora silvestre (altura de brote, longitud de raíz y número de raíces) se empleó un DCA, los tratamientos fueron evaluados por su significación estadística a través de un ANVA con submuestreo, y las medias fueron comparadas utilizando la prueba LSD 0,05 de nivel de significación. En los parámetros número de brotes y número de raíces, los datos fueron transformados mediante la $\sqrt{Y+0,5}$ (Steel y Torrie, 1985) antes de someterlos al ANVA. Todos los datos fueron procesados empleando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) for Window V8.

Tabla 3. Reguladores de crecimiento auxinas, giberelinas y citocininas empleados en la enraizamiento *in vitro* del acceso 004-Rsp-UNTRM de zarzamora silvestre (*Rubus* sp.) recolectado en el Centro Poblado San Salvador, distrito de Luya, Amazonas.

Trat.	Reguladores de crecimiento (mg/L)					Referencia
	Auxinas			Citocin.	Giberel.	
	ANA	AIB	AIA	BAP	AG3	
RR1	---	0,5	---	---	---	Bobrowski <i>et al.</i> , 1996
RR2	---	2,0	---	---	---	Cancino-Escalante <i>et al.</i> , 2015
RR3	---	1,0 ^a	---	---	---	Wu <i>et al.</i> , 2009
RR4	---	1,0 ^b	---	---	---	Wu <i>et al.</i> , 2009 (modificado)
RR5	---	---	0,1	2,0	0,1	Ramírez y Angarita, 1990
RR6	1,0	2,0	---	---	---	Millones, 2009

III. RESULTADOS

En la caracterización biométrica, los frutos de los accesos de zarzamora silvestre 003, 004 y 005-Rsp-UNTRM (Figura 1A-1C) registraron similares valores en los parámetros diámetro polar, ecuatorial y peso de fruto (Tabla 4). Asimismo, mediante estos valores obtenidos, los accesos se pueden agrupar en frutos de mayor tamaño y peso (accesos 003, 004 y 005-Rsp-UNTRM) y frutos de menor tamaño y peso (acceso 001 y 002-Rsp.-UNTRM). Con respecto a los caracteres proximales, en la Tabla 4 se muestra que los valores de °brix y % de acidez fueron similares, siendo el acceso 005-Rsp-UNTRM el que mostró valores menores de % de acidez.

La etapa de establecimiento fue posible con el uso de cloruro de mercurio 0,1%, permitiendo la inhibición de los microorganismos presentes en las yemas axilares y prosperaran en el medio de cultivo de establecimiento.

A través del uso de AG3 0,1 mg/L más una baja concentración de la citocinina kinetina 0,04 mg/L, fueron las concentraciones adecuadas para el crecimiento y desarrollo de los explantes de zarzamora *in vitro* (Figura 2D), revelados en los parámetros altura de brote, número de hojas, número de brotes axilares, porcentaje de sobrevivencia (Tabla 5) y ausencia de clorosis en la hoja (Figura 3). Por el contrario, los tratamientos con concentraciones de AG3 0,1 mg/L combinados con citocininas KIN, BAP y 2iP 0,1 mg/L, exhibieron disminución en el crecimiento y desarrollo de los explantes, mostrando además hojas con clorosis grado 4 y 5 (alta clorosis y muy alta clorosis) (Figura 3). Asimismo, los explantes llegaron a registrar notas de grado 6 (tejido fenolizado) con el uso de las citocininas KIN y BAP en el medio de cultivo de propagación (Figura 2F).

Tabla 4. Caracterización biométrica y proximal en frutos de los accesos de zarzamora silvestre (*Rubus* sp.) recolectados en el Centro Poblado San Salvador, distrito de Luya, Amazonas.

Acceso de zarzamora silvestre	Caracteres biométricos			Caracteres proximales	
	Media de diámetro polar (mm) ¹	Media de diámetro ecuatorial (mm) ¹	Peso (g) ¹	°Bx	% de acidez
001-Rsp-UNTRM	14,6 ± 2,3 b	12,7 ± 0,8 c	1,3 ± 0,3 c	8,6 ± 0,6	2,8 ± 1,1
002-Rsp-UNTRM	13,7 ± 1,3 b	13,6 ± 1,0 b	1,3 ± 0,2 c	8,5 ± 0,3	2,0 ± 0,1
003-Rsp-UNTRM	18,6 ± 1,8 a	14,9 ± 1,1 a	2,5 ± 0,4 a b	7,4 ± 0,2	2,6 ± 0,1
004-Rsp-UNTRM	18,6 ± 1,8 a	14,5 ± 1,1 a	2,4 ± 0,5 b	8,0 ± 0,7	2,1 ± 0,1
005-Rsp-UNTRM	19,5 ± 5,2 a	14,9 ± 0,1 a	2,8 ± 0,9 a	7,2 ± 0,1	1,4 ± 0,1

¹Diferentes letras indican diferencias significativas entre los accesos de zarzamora silvestre para $p \leq 0,05$ de acuerdo a la prueba LSD.

Tabla 5. Efecto de los reguladores de crecimiento AG3 y citocininas en la altura de brote, número de hojas, número de brotes axilares y porcentaje de sobrevivencia de explantes a los 28 días de cultivado *in vitro* el acceso 004-Rsp-UNTRM de zarzamora silvestre (*Rubus* sp.) recolectado en el Centro Poblado San Salvador, distrito de Luya, Amazonas.

Ttos.	AG3 (mg/L)	Citocininas (mg/L)			Altura de brote (mm) ¹	Nº de hojas ¹	Nº de brotes axilares ¹	% de sobrevivencia de explantes
		KIN	BAP	2iP				
Testigo	0,1	0,04	---	---	16,6 ± 2,4 a	7,6 ± 0,9 a	3,4 ± 0,5 a	100
AGC1	0,1	0,1	---	---	5,3 ± 2,6 b	4,0 b	1,0 b	80
AGC2	0,1	---	0,1	---	8,3 ± 2,8 b	5,5 ± 0,6 b	1,5 ± 0,7 b	80
AGC3	0,1	---	---	0,1	6,9 ± 1,6 b	4,6 ± 0,5 b	1,0 b	100
AGC4	0,2	0,1	---	---	6,9 ± 3,1 b	4,0 b	1,0 b	60
AGC5	0,2	---	0,1	---	7,9 ± 1,5 b	4,3 ± 0,5 b	1,0 b	80
AGC6	0,2	---	---	0,1	4,6 ± 2,6 b	4,0 ± 1,0 b	1,0 b	100
AGC7	0,4	0,1	---	---	8,9 ± 0,5 b	4,8 ± 0,5 b	0,0 b	80
AGC8	0,4	---	0,1	---	6,6 ± 2,7 b	4,2 ± 0,8 b	0,0 b	100
AGC9	0,4	---	---	0,1	5,8 ± 2,4 b	4,0 ± 0,7 b	1,0 b	100

¹ Diferentes letras indican diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos AGC1-9 de los accesos de zarzamora silvestre para $p \leq 0,05$ de acuerdo a la prueba de Dunnett.

En la Tabla 6 se aprecia que los parámetros altura de brote y longitud de raíz los tratamiento no mostraron diferencias significativas. En tanto, con respecto al parámetro números de raíces se aprecia que el empleo de 1 o 2 mg/L de la auxina AIB en el medio de cultivo de enraizamiento, se experimentó un mayor número de raíces y porcentaje de inducción de raíces adventicias en los brotes (Figura 4C), permitiendo mayor éxito en la fase de aclimatación (Figura 4D).

Tabla 6. Efecto de los reguladores de crecimiento auxinas, citocininas y giberelinas en la altura de brote, longitud de raíces, número de raíces y porcentaje de enraizamiento de explantes a los 60 días de cultivo *in vitro* del acceso 004-Rsp-UNTRM de zarzamora silvestre (*Rubus* sp.) recolectado en el Centro Poblado San Salvador, distrito de Luya, Amazonas.

Tto.	Reguladores de crecimiento (mg/L)					Altura de brote (cm) ^c	Longitud de raíz (cm) ^c	Nº de raíces ³	% induc. de raíz
	Auxina			Cit.	Gib.				
	ANA	AIB	AIA	BAP	AG3				
RR1	---	0,5	---	---	---	3,1 ± 0,6 a	12,4 ± 6,8 a	1,4 ± 0,5 b c	66,7
RR2	---	2,0	---	---	---	2,7 ± 0,4 a	8,9 ± 6,0 a	1,6 ± 0,8 a b	91,7
RR3	---	1,0 ¹	---	---	---	2,5 ± 0,7 a	8,6 ± 6,5 a	1,0 ± 0,0 a b c	91,7
RR4	---	1,0 ²	---	---	---	2,6 ± 0,5 a	11,7 ± 10,2 a	1,7 ± 0,8 a	91,7
RR5	---	---	0,1	2,0	0,1	2,9 ± 1,0 a	4,4 ± 0,0 a	1,0 ± 0,0 d	8,3
RR6	1,0	2,0	---	---	---	3,3 ± 1,2 a	3,5 ± 3,2 a	1,1 ± 0,4 c	58,3

¹ Sacarosa 1,5%

² Sacarosa 3,0%

³ Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos de enraizamiento de los accesos de zarzamora silvestre para $p \leq 0,05$ de acuerdo a la prueba LSD.

IV. DISCUSIÓN

Los frutos de zarzamora silvestre (*Rubus* sp.) accesos 003, 004 y 005-Rsp-UNTRM registraron pesos entre 2,4 a 2,8 g, valor muy por debajo de los registrados por Vergara *et al* (2016) en la especie *R. glaucus* (15,3 a 21,9 g) en Cundinamarca, Colombia; indicando ser una zona caracterizada por el buen potencial agroclimático que mejora el desarrollo a nivel de planta y fruto. Carvalho y Bentancurt (2015) registraron valores de peso en *R. glaucus* de 6,8 a 7,2 g en Antioquia, Colombia. Por otro lado, los accesos 003, 004 y 005-Rsp-UNTRM registraron valores de 7,2 a 8,0 ° brix y porcentajes de acidez de 1,4 a 2,6, valores similares a los reportados por Vergara *et al.* (2016) 7 a 8 ° brix y 2,5 % de acidez, Carvalho y Bentancurt (2015), 9,1 a 10,6 ° brix y 1,8 a 2,1 % de acidez. Por tanto, es adecuado conocer las cualidades agroindustriales de los frutos de zarzamora silvestre con la finalidad de desarrollar paquetes

tecnológicos que permita identificar zonas potenciales para la producción de zarzamora en la región Amazonas.

En la etapa de establecimiento de yemas axilares de zarzamora silvestre el uso de cloruro de mercurio 0,1% por 15 minutos, permitió la inhibición de los microorganismos presentes en las yemas axilares, prosperando en el medio de cultivo de establecimiento, en comparación con el uso de hipoclorito de sodio que fue ineficaz en la eliminación de microorganismos de los explantes. Similar capacidad de esterilización de los explantes fueron obtenidos por Jagatheeswari y Ranganathan (2012), empleando cloruro de mercurio 0,1% por 8 minutos en esquejes de *Stevia rebaudiana* Bert. obteniendo un 80% de explantes asépticos en comparación con el uso de hipoclorito de sodio que fue baja el porcentaje de sobrevivencia de los explantes.

El empleo de un medio de meristemas desarrollado por Espinoza *et al.* (1992) fue el adecuado para el crecimiento y desarrollo de yemas axilares de zarzamora *in vitro*, similares resultados de adecuado crecimiento y desarrollo de explantes fueron registrados en yemas axilares de piña ecotipo Santa Rosa (Millones, 2009), crecimiento y desarrollo de embriones cigóticos de *Cinchona crassifolia* (Millones y Vásquez, 2011), pitahaya amarilla (Millones y Vásquez, 2010) y *Plukenetia volubilis* (Millones y Vásquez, 2008).

Wu *et al.* (2009), indican que algunas especies del género *Rubus* registran complicaciones para el cultivo *in vitro*, resultando en una baja tasa de micropropagación, promovido por el rápido crecimiento de los brotes, clorosis de la hoja y la subsecuente fenolización del explante. En la presente investigación, el empleo de la combinación de AG3 y citocininas (KIN, BAP y 2iP) los explantes experimentaron menor crecimiento, menor proliferación de brotes y clorosis de la hoja, divergiendo con los resultados obtenidos por Sigarroa-Rieche y García-Delgado (2011), quienes utilizando una combinación de BAP (1 mg/L) y AG3 (0,5 mg/L) lograron una mayor longitud de brote y mayor proliferación de brotes en *R. glaucus*.

El empleo de 1 o 2 mg/L de la auxina AIB en el medio de cultivo de enraizamiento, se experimentó un mayor número de raíces y porcentaje de inducción de raíces adventicias en los brotes (1,6 raíces adventicias y 91,7% de sobrevivencia), similares resultados fueron obtenidos por Cancino-Escalante *et al.* (2015) al emplear 2 mg/L de AIB en el enraizamientos de brotes de *R. glaucus*. Wu *et al.* (2009) obtuvieron buenos resultados de

enraizamiento de los brotes sin formación de callo al emplear el AIB en una concentración de 1 mg/L de AIB, en la presente investigación los explantes al emplear dosis de 1 y 2 mg/L de AIB los explantes no indujeron callo. Por tanto, el empleo de AIB en el medio de cultivo de enraizamiento experimentó mejores resultado que cuando este regulador de crecimiento fue combinado con ANA (Millones, 2009), o cuando se empleó la combinación de reguladores de crecimiento AIA, BAP y AG3 (Ramírez y Angarita, 1990).

V. CONCLUSIONES

El establecimiento *in vitro* de las yemas axilares de zarzamora silvestre fue obtenido cuando se utilizó cloruro de mercurio 0,1% por un periodo de 15 minutos, permitiendo la inhibición de microorganismos en el medio de cultivo de establecimiento.

El uso de AG3 0,1 mg/L más kinetina 0,04 mg/L, fueron las concentraciones adecuadas para el crecimiento y desarrollo de las yemas axilares de zarzamora silvestre *in vitro*.

La auxina AIB en una concentración de 1 o 2 mg/L en el medio de cultivo de enraizamiento, los brotes experimentaron un mayor número de raíces y porcentaje de inducción de raíces adventicias

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accioly, A.M.A., Siqueira, J.O., Curi, N. y Moreira, F.M.S. (2004). Amenização do calcário na toxidez de zinco e cádmio para mudas de *Eucalyptus camaldulensis* cultivadas em solo contaminado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 28(4): 775-783.
- Bobrowski, V.L., Mello-Farias, P.C. y Peters, J.A. (1996). Micropropagation of blackberries (*Rubus* sp.) cultivars. *Revista Brasileira de Agrociências*, 2(1): 17-20.
- Cancino-Escalante, G.O.; Quevedo, E., Edilia, C. y Díaz, C. (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.
- Carvalho, C.P., Betancur, J.A. (2015). Quality characterization of Andean blackberry fruits (*Rubus glaucus* Benth.) in different maturity stages in Antioquia, Colombia. *Agronomía Colombiana*, 33(1): 74-83.
- Dotor-Robayo, M. Y., González-Mendoza, L. A., Castro, M. A., Morrillo-Coronado, A. C., y Morrillo-Coronado, Y. M. (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.
- Espinoza, N., Lizárraga, R., Sigüeñas, C., Buitrón, F., Bryan, J. y Dodds, J.H. (1992). Cultivo de tejidos: micropropagación, conservación y exportación de germoplasma de papa. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP).
- Jagatheeswari, D. y Ranganathan, P. (2012). Studies on micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bert. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3(2): 315-320.
- Millones, C.E. (2009). Desarrollo de técnicas de cultivo in vitro para la micropropagación de plantas de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) ecotipo Santa Rosa provenientes de la provincia de Rodríguez de Mendoza, región Amazonas. *Investigaciones Amazonenses*, 3(1): 7-11.
- Millones, C.E. y Vásquez, E.R. (2008). Micropropagación de plantas de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) provenientes de la provincia de Rodríguez de Mendoza, región Amazonas. *Investigaciones Amazonenses*, 2(1): 7-11.
- Millones, C.E. y Vásquez, E.R. (2010). Micropropagación de plantas derivadas de semillas botánicas de pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* Britton & Rose) provenientes de la provincia de Utcubamba, región Amazonas. *Investigaciones Amazonenses*, 4(1): 34-38.
- Millones, C.E. y Vásquez, E.R. (2011). Efecto de los reguladores de crecimiento para la germinación y propagación in vitro de *Cinchona crassifolia* Pav provenientes del distrito de Huancas, región Amazonas. *Investigaciones Amazonenses*, 5(1): 82-87.
- Mroginski, L.A. y Roca, W.M. (Ed.). (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. En Mroginski, L.A. y Roca, W.M. (Ed.), *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamento y aplicaciones* (pp. 19-40). Cali, Colombia: Editorial Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid grown and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473 – 497.
- Ruiz Sánchez, L.J. y Sepúlveda, O.I. (2016). Análisis nutricional y nutraceutico de frutos de *Rubus glaucus* Benth (mora de castilla) material sin espinas cultivado en Apia Risaralda. (Tesis de Pregrado), Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia.
- Sigarroa-Rieche, A.K. y García-Delgado, C.L. (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.

Steel R.G.D. y Torrie, J.H. (1985). Bioestadística: Principios y procedimientos. Bogotá, Colombia: McGraw-Hill Latinoamericana.

Vergara, M.F., Vargas, J. y Acuña, J.F. (2016). Physicochemical characteristics of blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) fruit from production zones of Cundinamarca, Colombia. *Agronomía Colombiana*, 34(3): 336-345.

Wada, S., y Reed, B. M. (2011). Optimized scarification protocols improve germination of diverse *Rubus* germplasm. *Scientia Horticulturae*, 130(3), 660-664.

Wu, J., Miller, S.A., Hall, H.K. y Mooney, P.A. (2009). Factors affecting the efficiency of micropropagation from lateral buds and shoot tips of *Rubus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 99 (1): 17-25.