

ESTUDIOS PRELIMINARES PARA LA PROPAGACION CLONAL "in vitro" DE MORA (*Rubus glaucus* L.)¹

AMPARO RAMIREZ DEL CASTILLO² y ANTONIO ANGARITA ZERDA³

Resumen. Con el objeto de obtener *in vitro* plántulas de mora (*Rubus glaucus* L.) que permitan adelantar la micropropagación de la especie, se obtuvieron yemas axilares activas de plantas de mora cultivadas en invernadero. Dichos explantes fueron llevados a tubo de ensayo, después de eliminar primordios foliares más externos. Se encontró que una inmersión en hipoclorito de sodio al 0,5% por cinco minutos dio el mejor resultado para desinfección; concentraciones y tiempos mayores no promueven supervivencia del explante. En segundo término se definió el uso del mejor antioxidante, ya que se detectó un proceso de oxidación generalizado desde el inicio del cultivo *in vitro*. Al probar varios antioxidantes y clases de sustratos se determinó como el mejor antioxidante el ácido ascórbico (100 ppm) adicionado a la solución nutritiva y como mejor sustrato el líquido sobre papel.

Se realizaron ensayos con el objeto de obtener un balance hormonal óptimo. Se probó el efecto de Kinetina y la BAP en diferentes concentraciones adicionadas a un medio básico MS suplementado con ANA (0,1 ppm); calificando desarrollo de plántula, número de folíolos y presencia de callo; se determinó la BAP (2ppm) como responsable del mejor resultado. En el siguiente ensayo se probó interacción citoquinina-giberelina; los mejores resultados se obtuvieron con AG3 (1ppm) y BAP (2ppm). Pos-

teriormente se planteó un ensayo con el objeto de obtener tallos verdaderos y brotes múltiples, para lo cual se quiso probar AIA en interacción con las hormonas anteriormente probadas, con concentraciones de AIA de 0.1 ppm, BAP (2ppm) y AG3 (1ppm) obteniendo como resultado de esta interacción plántulas óptimas para micropropagación. Los datos de la valoración de desarrollo de las plántulas, brotes múltiples, tallo verdadero, número de folíolos, presencia o no de callos, presencia o ausencia de raíces, fueron analizados estadísticamente con base en un diseño completamente al azar y contrastes ortogonales lo que permitió precisar las concentraciones mencionadas.

A partir de plántulas en desarrollo se probó enraizamiento directo con IBA (50 ppm) y trasplante a sustrato (suelo: arena) obteniendo proliferación de raíces y supervivencia *ex vitro* de plántulas provenientes de tubo de ensayo.

Habiendo obtenido *in vitro* elongación de tallos verdaderos y vástagos múltiples se continúa con la etapa de micropropagación, con lo cual se espera la obtención masiva de plantas de mora y proyectar futuras investigaciones con base en estos resultados preliminares.

PRELIMINARY STUDIES ON *in vitro* CLONAL PROPAGATION OF BLACKBERRY (*Rubus glaucus* L.)

Summary. From tissue culture actively-growing axillary buds of blackberry *Rubus glaucus* L. has been achieved suitable plants to initiate a micropropagation system. This is the most appropriate method for produce plants in a short period than another method. The explants were grown on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with inositol (100 mg/l), thiamine-HCl (0.4 mg/l)

¹ Adaptación de la Tesis de Grado presentada por el autor principal para optar el Título de Magister Scientiæ en el programa de estudios para graduados de la Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.E.

² Investigadora adscrita a la Sección de Investigaciones de la Estación La Florida, Inderena.

³ Profesor asociado de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D.E. A.A. 14490.

sucrose (30 g/l) and growth regulators.

The pH was adjusted to 5.7-5.8 prior to autoclaving. The glass tubes with the medium were sealed and autoclaved for 20 min at 120°C and 20 P.S.I.

The explants were disinfected in 0.5% sodium hypochlorite for 5 min and aseptically transferred to test tubes and sealed. The cultures were maintained at day/night temperature of 24°C/28°C under 18 hr of light.

Both liquid-paper and agar solidified media were evaluated; the liquid-paper had more advantages. Ascorbic acid (100 mg/l) was added to liquid-paper medium in order to control oxidation.

About 8 weeks later, better results on survival and growth were obtained by the addition of benzylaminopurine-BAP (2 ppm), indolacetic acid-AIA (0.1 ppm) and gibberellic acid (1 ppm) to MS medium.

INTRODUCCION

Dentro de las especies del género *Rubus* que existen en Colombia, la mora de castilla *Rubus glaucus* L. es hoy objeto de demanda tanto en el mercado nacional como internacional. El tópicó de mayor importancia lo constituye su propagación vegetativa. En campo se logra a través de acodo terminal principalmente.

El objetivo de este trabajo fue lograr plántulas de mora a partir de cultivo *in vitro* de yemas axilares teniendo como objetivos específicos el lograr cultivos asépticos en ensayos de control de contaminación, lograr como otro objetivo el control de la oxidación y obtener la regeneración de plántulas en tubo de ensayo permite plantear la obtención de plantas a través de la micropropagación y posteriormente investigar la posibilidad de obtener clones seleccionados para incrementar la producción y responder mejor a la demanda creciente de esta fruta todo lo cual redundaría en favor del sector productivo.

La propagación *in vitro* de varios cultivares del género *Rubus* ha sido reportada por varios laboratorios en el mundo, siendo objeto de investigación el tipo y la fuente del explante, los métodos de desinfección, los métodos de control de oxidación y los medios de cultivo.

En frambuesa se han propagado ápices de vástagos (Pyott y Converse, 1981. Broome y

Zimmermann 1978); Vástagos axilares para pruebas de elongación (Gebhardt), meristemas de yemas axilares y terminales (Welander, 1985), (Babic y Neskovic 1984). Para la desinfección se recomienda en general el uso de etanol a 70%, del Hipoclorito de sodio o calcio en concentraciones de 0.1% por tiempos entre 1 a 15 minutos. Harper (1978) recomienda una doble esterilización con hipoclorito de sodio (0,14%) por 1 minuto más "Tween 20" seguida por una segunda esterilización con etanol al 70% y el uso de BenomyI (0,1%) por 15 minutos seguida de otro enjuague en hipoclorito de sodio (0,5%) por 30 minutos. Todos recomiendan lavados sucesivos en agua estéril por 3 veces consecutivas.

En aspectos como control de oxidación, proceso que se presentó en las primeras etapas de cultivo recomiendan el uso de ácido ascórbico, ácido cítrico, L-cisteína y carbón activado (Montes, 1987). La oxidación se debe principalmente a la presencia de compuestos altamente oxidantes como el ion superóxido, metales oxidantes y compuestos de tipo feniólico que originan diferentes tipos de oxidación. También recomiendan recultivos a medios de cultivo frescos cada dos días.

En medios de cultivo Pyott y Converse (1981) recomiendan para primer y tercer estadio incluir las sales de MS (Murashige y Skoog 1962) un cuarto más concentradas y usar Bencilamino-purina (BAP), ácido indol butírico (IBA) y ácido giberélico (AG₃) en 2, 0.05 y 0.1 mg/l respectivamente. Para proliferación recomiendan BAP en 1,2,3,5 mg/l e IBA 0,05 mg/l.

Gebhardt (1985) en ensayos de enraizamiento *in vitro* de subexplantes recomienda el uso de macroelementos a la mitad de su concentración según Murashige (1962). En trabajos de micropropagación Welander (1985) obtuvo en la etapa de establecimiento mejores resultados con Ca (NO₃)₂ y NH₄ NO₃ reducidos a la mitad suplementados BAP (0,2 mg/l) e IBA (0.01 mg/l). Para proliferación BAP en 1.0 mg/l incrementó el número de vástagos y el AG₃ (3,0 mg/l) promovió altura de vástagos.

También se probó enraizamiento *in vitro* obteniendo el 100% de éxito en un medio con macroelementos diluidos a 1/5 mas IBA 0,01 mg/l.

Según varios autores de los mencionados

anteriormente hay factores que afectan la capacidad de establecimiento *in vitro* de meristemos de estas especies. Tales factores serán la influencia estacional, la tasa de infección, el estado fisiológico activo o nódulo de la fuente del explante, características de las especies, diferentes respuestas para enlogación con giberelinas exógenas, AG₃ que inhibe enraizamiento; ausencia de hormonas o muy baja concentración de auxinas se recomiendan para inducir raíces en especies de *Rubus*, dilución de macroelementos para mejorar resultados de supervivencia y enraizamiento y buena influencia del carbón activado por inducir raíces.

En mora exactamente algunas referencias reportan los resultados para diferentes cultivares. Según Babic y Noskovic (1984) en ensayos de propagación de tres variedades de mora se cultivaron ápices en agar con solución mineral de MS, Sacarosa al 3% m-inositol 100 mg/l, tiamina 0,4 mg/l, piridoxima 0,5 mg/l y ácido nicotínico 0,5 mg/l en 16 H de luz. Estudiando especialmente la fase inicial (10 primeras semanas) encontraron que la solución MS fue mejor que la Nitsch y la influencia del AIA (1 mg/l) mejor que IBA en la misma concentración logrando mayor porcentaje de supervivencia (70-75%), generando ramificaciones y disminuyendo la generación de callos. Vástagos múltiples se consiguieron usando IBA 0,1 mg/l más BAP y AG₃ en concentraciones de 1,0 mg/l y 0,1 mg/l. Al eliminar auxinas y AG₃ se redujo la tasa de multiplicación.

Plantas de mora de las variedades "Boysberry", "Younberry" y "Evergreen" suministraron los ápices (ápices 1-2 cm) para propagación iniciando con proliferación de vástagos; fueron cultivados por Skirvin et al (1981) en un medio para proliferación que contenía: sales minerales, vitaminas myo-inositol (100 mg/l), ANA (0,1 mg/l) ácido ascórbico (50 mg/l), sacarosa (30 g/l), BA (2 mg/l), agar (10 mg/l), pH 5.7. Los vástagos obtenidos fueron transferidos a enraizamiento directo con éxito.

En propagación comercial de mora (Broome et al 1978) se usó el medio de cultivo de Murashige y Skoog, suplementado con: Tiamina 0.4 mg/l, Myo-inositol 100 mg/l, B.A. 1.0 mg/l, AG₃ 0.1 mg/l, IBA 1.0 mg/l, sacarosa 30 mg/l, agar 7. gr/l, pH 5.7 a 5.8.

El medio líquido fue estimulante para el establecimiento de explantes de mora comparado con el medio semi-sólido; se lograron vástagos de 2.5 cm, después de cuatro semanas. La máxima multiplicación fue lograda con subcultivos sucesivos. Así mismo se logró enraizamiento *ex vitro* usando enraizador comercial a base de auxinas.

Zimmerman et al 1980 reportan en su trabajo el uso de ácido indolbutírico (0,3%) para mejorar el enraizamiento *ex vitro*. El mejor sustrato fue una mezcla de turba, (1:1) y arena. Se demostró que la posición del nudo no tiene efecto sobre el porcentaje de enraizamiento. En rosa en cultivo *in vitro*, se probó que la posición de las yemas en el tallo sí es importante. Las condiciones de este enraizamiento *ex vitro* son las mismas usadas para la adaptación de plantas logradas *in vitro*, en cuanto a humedad relativa, temperatura en invernadero (18°C - 35°C) y foto-período.

En el trabajo de micropropagación de frambuesa (*Rubus idaeus*) cv. "Heritage" las puntas meristemáticas fueron cultivadas con los macroelementos de Murashige y Skoog (1962); en este primer medio los explantes fueron cultivados por varias semanas con 16 horas luz, 26°C. Los cultivos con vástagos en crecimiento fueron transferidos a un segundo medio con doble dosis de FeEDTA (40 mg/l), 5 g de carbón activado y sin hormonas de crecimiento. En el primer medio, después de 4 semanas el desarrollo fue de tipo arrosado con varias hojas. Estas plantas fueron transferidas al segundo medio sin hormonas donde se obtuvo desarrollo de vástagos alargados.

En general reportan en relación citoquinina/auxina una concentración superior para la primera: el uso de AG₃ de 1 a 3 mg/l y la exclusión de hormonas o inclusión de auxinas solamente para inducir raíces. Se recomienda también inmersión en IBA (50 mg/l) por 18 horas para inducir enraizamiento directo.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, Seccional Bogotá.

Las plantas de donde se tomaron los explantes crecieron bajo invernadero con una densidad de siembra de 6512 pl/ha, propagadas por acodo de punta. A los seis meses de la siembra definitiva se tomaron las yemas necesarias para llevar a cultivo in vitro. El invernadero está localizado en la finca denominada Canoas II, ubicada en el municipio de Soacha-Cundinamarca.

Se cultivó en medio MS (1962); se prepararon soluciones madres que se almacenaron en oscuridad a 4°C hasta su utilización, se tomaron alicuotas para obtener una concentración final en el medio. (Cuadro 1) Dispensadas las alicuotas se prosiguió con el ajuste del volumen, pH (5,7) y se adicionó la sacarosa (30 g/L) y el agar (6 g/L).

Al decidir la utilización del medio líquido, el soporte del tejido fue una tira de papel de filtro en posición de U invertida por la cual asciende la solución. Una vez agregado al agar (opcional según el ensayo) y el azúcar se calentó la solución, para conseguir dilución y homogenización. En el paso siguiente se dispuso a cada tubo de ensayo la cantidad de medio preestablecido. Todos los tubos con el medio de cultivo y el material de vidrio que se usó para la siembra en la cámara de flujo laminar se llevaron con anterioridad al autoclave para esterilización húmeda a 20 p.s.i. y 121°C por 20 minutos.

Preparación de los explantes. Con ayuda de tijeras desinfectadas se retiraron de la planta los tallos que se cortan en segmentos de 20 cm. aproximadamente; de cada estaca se obtuvieron las yemas que correspondieron al explante primario. Las estacas se lavaron en una solución de Benomyl (400ppm) y sulfato de estreptomycin (100 ppm), con el objeto de impedir proliferación de patógenos. El proceso de siembra, se llevó a cabo en cámara de flujo laminar en condiciones de máxima asépsia. Con estas condiciones se controla la posible contaminación ambiental. Al retirar las yemas se aplicaron los tratamientos de desinfección establecidos para el experimento No. 1 de desinfección. (Cuadro 2)

Establecido el mejor método de desinfección, se determinó en los experimentos siguientes (ensayos segundo y tercero) el

Cuadro 1. Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962).

Compuesto	Concentración en el medio
1. NH ₄ NO ₃	1650 mg/L
2. K N O ₃	1900 mg/L
3. H ₃ BO ₃	6.20 mg/L
K ₂ H ₂ PO ₄	170.0 mg/L
K.I	0.83 mg/L
NaMoO ₄ H ₂ O	0.25 mg/L
CoCl ₂ H ₂ O	0.025 mg/L
4. CaCl ₂ 2 H ₂ O	440.0 mg/L
5. MgSO ₄ 7H ₂ O	370.0 mg/L
Mn SO ₄ 4 H ₂ O	22.30 mg/L
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	8.6 mg/L
Cu SO ₄ 5H ₂	0.025 mg/L
6. Na ₂ EDTA	37.35 mg/L
Fe SO ₄ 7 H ₂ O	27.85 mg/L

Cuadro 2. Tratamientos para desinfección de explantes.

Tratamiento	Inmersión de Explantes en	%	Tiempo de Inmersión Minutos
1	Hipoclorito de sodio	0.5	5
1	Hipoclorito de sodio	1	5
3	Hipoclorito de sodio	2	5
4	Hipoclorito de sodio	0.5	10
5	Hipoclorito de sodio	1	10
6	Hipoclorito de sodio	2	10
7	Testigo		

NOTA: A cada solución de sodio se agregó una gota de "Tween-20" como detergente, se probaron 10 tubos por tratamiento.

compuesto antioxidante más apropiado y se concluyó sobre dos aspectos importantes en el control de la oxidación: Recultivo vs. no recultivo y diferencias entre medio líquido-papel y agar. Los tratamientos están definidos en los Cuadros 3 y 4.

Superados los problemas de contaminación y oxidación, se investigaron los efectos de los reguladores de crecimiento en los ensayos cuarto y sexto.

En el cuarto experimento se evaluó la acción de la Kinetina (K) y la Bencilamino-purina (BAP) en la regeneración de plántulas incluyendo en el medio el antioxidante probado (ácido ascórbico, 100 ppm), en este experimento se incluyó ácido naftalen-acé-

Cuadro 3. Evaluación de antioxidantes y de la consistencia del medio en el control de oxidación.

Tratamiento No.	Antioxidante	Concentración	Sustrato	Número de tubos
1	Acido ascórbico	100 ppm	Agar	10
2	Acido cítrico	100 ppm	Agar	10
3	L - cisteina	100 ppm	Agar	10
4	Carbón activado	3000 ppm	Agar	10
5	Testigo	- o -	Agar	10
6	Acido ascórbico	100 ppm	Líquido-papel	10
7	Acido cítrico	100 ppm	Líquido-papel	10
8	L - cisteina	100 ppm	Líquido-papel	10
9	Carbón activado	3000 ppm	Líquido-papel	10
10	Testigo	0	Líquido-papel	10

Medio suplementado con AIA 0.01 ppm. Kw2 ppm.

Cuadro 4. Evaluación del ácido ascórbico sólo y en combinación con ácido cítrico y del sistema de recultivo en el control de oxidación.

Tratamiento No.	Antioxidante	Concentración	Número Tubos
S I N R E C U L T I V O	1 Testigo	- o -	20
	2 Acido ascórbico	100 ppm	20
	3 Acido ascórbico y Acido cítrico	100 ppm 50 ppm	20
	4 Acido ascórbico y Acido cítrico	100 ppm 100 ppm	20
C O N	5 Testigo	- o -	20
R E C U L T I V O	6 Acido ascórbico	100 ppm	20
	7 Acido ascórbico y Acido cítrico	100 ppm 50 ppm	20
	8 Acido ascórbico y Acido cítrico	100 ppm	20

NOTA: Este experimento se realizó en medio líquido con soporte de papel de filtro; el recultivo se hizo cada ocho días. Medio suplementado con ANA 0.1 ppm. BAP 2 pp.

tico (0.1 mg/l) y AG₃ 0. mg/l en medio básico de M.S. (Cuadro 5).

En el quinto ensayo se evaluó el efecto del ácido giberélico (AG₃) en combinación con las citoquininas probadas anteriormente (Cuadro 6).

En el último ensayo se probó la interacción del ácido indol-acético (AIA) en combinación con las hormonas probadas anteriormente: BAP 2 ppm y AG₃ 1 ppm. Los tratamientos aparecen en el Cuadro 7. Se usó medio básico MS.

RESULTADOS Y DISCUSION

Al evaluar el aspecto contaminación se encontró que con el uso del desinfectante se lograba el control de la contaminación superficial de las yemas; con base en las observaciones se hicieron análisis de varianza y contrastes ortogonales para encontrar la concentración óptima: el hipoclorito de sodio al 0,5% por cinco minutos dio los mejores resultados; se pudo observar que tiempos prolongados (10') y concentraciones superiores podrían tener un efecto fitotóxico y no favorecerían el desarrollo de explante.

En el segundo ensayo en el cual se probó el tipo de antioxidante y el tipo de sustrato, basando el análisis en los totales de tratamientos obtenidos por transformación de porcentajes, se evidenció que el mejor tratamiento fue el T₆ señalado en el Cuadro 3, el cual corresponde a ácido ascórbico 100 ppm en medio líquido-papel. El ácido ascórbico al actuar como antioxidante reduce radicales oxidantes como el H₂O₂, su oxidación a hidro-ascórbico está catalizado por la enzima ascorbato oxidasa; con frecuencia la oxidación se presenta en la base del explante (Figura 1).

Al probar el efecto del recultivo y del ácido ascórbico solo y en combinaciones con ácido cítrico (Cuadro 4) se comprobó según análisis de varianza que se daban diferencias significativas entre tratamientos, es decir, entre compuestos; al evaluar la interacción entre cultivo y no recultivo y el tipo de antioxidantes se encontró que la interacción era válida y que efectivamente el tratamiento en el que se presentó menor oxidación correspondió al tratamiento T₂ ácido ascórbico 100 ppm sin recultivo. Podría suponerse que al someter el tejido a recultivos consecutivos se pueda estimular el proceso de oxida-

Cuadro 5. Evaluación de la acción de la Kinetina y el BAP en la regeneración de plántulas a partir de yemas.

Tratamiento	Citoquinina	Concentración
1	Testigo	- o -
2	Kinetina	1 mg/L
3	Kinetina	5 mg/L
4	BAP	2 mg/L
5	BAP	4 mg/L

NOTA: Medio basal M.S. ANA 0.1 mg/L. AG₃ 0.1 mg/L, Tiamina 0.4 mg/L m-inositol 100 mg/L, sacarosa 30 gr/l pH 5.7, ácido ascórbico 100 ppm. medio líquido-papel.

Cuadro 6. Evaluación de la acción de AG₃, Kinetina y BAP en diferentes concentraciones y combinaciones en la regeneración de plántulas a partir de yemas.

Tratamiento No.	AG ₃ (ppm)	Kinetina (ppm)	B A P (ppm)
T ₁	0.1	0	0
T ₂	0.1	1	0
T ₃	0.1	5	0
T ₄	0.1	0	2
T ₅	0.1	0	4
T ₆	1	0	0
T ₇	1	1	0
T ₈	1	5	0
T ₉	1	0	2
T ₁₀	1	0	4
T ₁₁	2	0	0
T ₁₂	2	1	0
T ₁₃	2	5	0
T ₁₄	2	0	2
T ₁₅	2	0	4
T ₁₆	0		

NOTA: medio basal M.S.

Cuadro 7. Evaluación de la acción del AIA en diferentes concentraciones en regeneración, elongación y enraizamiento.

Tratamientos	Concentración AIA
T ₁	0 ppm
T ₂	0.1 ppm
T ₃	0.5 ppm
T ₄	1 ppm

NOTA: Medio basal M.S.

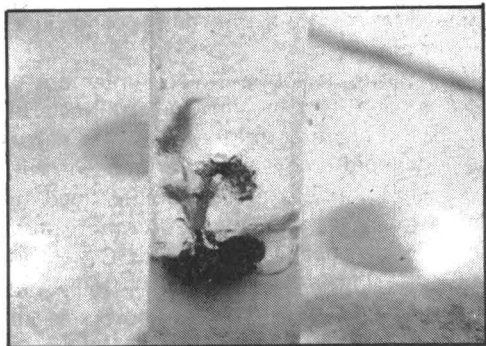


Figura 1. Necrosamiento en la base del explante causada por un proceso de oxidación.

ciones por daños superficiales al explante que pueden causar oxidaciones a nivel de membrana.

En el ensayo de regeneración de plántulas e influencia de las citoquininas BAP y Kinetina se evaluaron varios aspectos como número de folíolos, presencia o ausencia de callo y desarrollo de plántulas. Al analizar el efecto sobre el número de folíolos con base en análisis de varianza y contrastes se encontró que hay diferencia altamente significativas entre las dos citoquininas, siendo ventajosa la influencia de BAP, para la formación de callo, lo que hace suponer que BAP estimula el proceso de división celular. Calificado el vigor del desarrollo con base en una escala de calificación se encontró igualmente una diferencia altamente significativa entre BAP y K, siendo así evidente que BAP favorece el desarrollo de plántula; se puede suponer de acuerdo con otros investigadores que BAP tiene un efecto sinérgico con el ANA (0,1 ppm) y AG₃ (0,1 ppm) en división y alargamiento celular. Se asume entonces que la especie *R. glaucus* presenta una buena sensibilidad al BAP y que aún presentando las dos concentraciones probadas valores estadísticamente semejantes con BAP 2 ppm se induce menor formación de callo, lo que es deseable para el caso de micropropagación y el número de folíolos es aparentemente superior en dicha concentración. Como el tipo de desarrollo de plántula presenta un desarrollo aparentemente arrocetado se probó en el quinto ensayo el efecto del AG₃ en combinación con las dos citoquininas probadas.

Como se mencionó en el capítulo de materiales y métodos, el AG₃ fue suplementado al medio en concentraciones de 0,1, 1 y 2 ppm. Evaluados los mismos aspectos del ensayo anterior se concluyó que el tratamiento No. 9 (AG₃ 1 ppm y BAP 2 ppm) dió los mejores resultados.

Teniendo en cuenta estos resultados se diseñó un sexto experimento para analizar el efecto del ácido indol-acético en combinación con AG₃ (1 ppm) y BAP (2 ppm); habiendo encontrado en una primera evaluación a las cuatro semanas, presencia de tallos verdaderos y brotes múltiples, se optó por una segunda calificación a las 8 semanas. En este mismo experimento se probó enraizamiento *in vitro* bajo la influencia de la auxina incluida. Con base en la información obtenida en los análisis estadísticos fue posible concluir que para desarrollo de plántulas, número de folíolos y desarrollo de raíz los mejores resultados se lograron en el tratamiento No. 2, es decir en una concentración de 0,1 ppm de AIA. Esto sugiere que la mejor interacción auxina: citoquinina se logró con AIA 0,1 ppm y BAP 2ppp, por lo que podría pensarse que concentraciones mayores de auxina pueden contrarrestar el efecto de la citoquinina. En esta interacción BAP parece estimular mejor el desarrollo de hojas y el crecimiento de la plántula sin interferir en el desarrollo de raíces supuestamente estimulado por auxina; a su vez, esta concentración de AIA baja no es inhibitoria para elongación de entrenudos, ni formación de hojas y estimula el desarrollo de raíces.

Para la formación de tallo verdadero no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre 0,5 ppm y 0,1 ppm de AIA, lo mismo que para brotes múltiples, pero como la calificación de desarrollo de plántula, de hojas y raíces fue superior con 0,1 ppm de AIA, se puede apreciar que la interacción ventajosa es 2 ppm de BAP y 0,1 ppm AIA. Cabe anotar que en general la inclusión del AIA beneficia el crecimiento del explante; así mismo, la presencia de AG₃ (1 ppm) no inhibió la formación de raíces, favoreció el desarrollo de los tallos verdaderos (altura) ya que en este experimento se logró la presencia de tallos elongados y se superó el crecimiento arrocetado lo que permite iniciar el proceso de micropropagación (Figura 2).

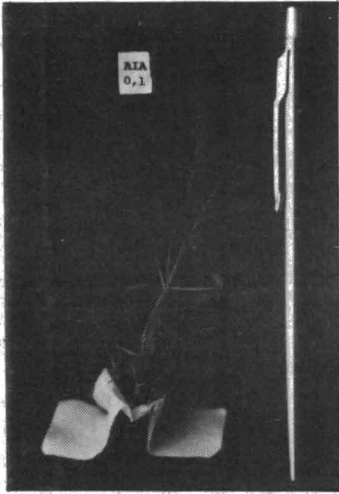


Figura 2. Plántula óptima para micropropagación lograda con la combinación de AIA, BAP y Ag₃.

Con explantes de crecimiento provenientes de diferentes ensayos se probó estimulación de raíces, haciendo inmersión de estos en una solución de IBA por 18 horas, según recomendación de Zimmerman (1980), de Broome (178) y Babic y Neskovic (1984). Este último recomienda una concentración de 50 ppm de IBA. Se observó un desarrollo de raíces aceptable al ser transplantados a una mezcla suelo: arena (1:1) pero se concluyó que aquellos explantes con mayor número de folíolos, sobreviven fácilmente. En la Figura 3 se aprecia el desarrollo de plantas



Figura 3. Plántulas de mora adaptadas a condiciones externas.

obtenidas *in vitro* y sometidas a condiciones de invernadero.

A partir de los resultados obtenidos se pudo concluir y recomendar el hipoclorito de sodio como agente desinfectante de yemas de mora es conveniente en concentraciones entre el 0.5% al 1% durante cinco minutos: concentraciones superiores y tiempos más prolongados son fito-tóxicos.

Los tejidos de mora se oxidan fácilmente. La oxidación puede controlarse con ácido ascórbico en concentraciones de 100 ppm y en medio líquido con soporte de papel filtro. El subcultivo o recultivo resultó ser inefectivo en el control de la oxidación.

El BAP en concentraciones de 1 a 4 ppm actúa en interacción con AIA y AG₃ como inductor callo y promotor del desarrollo foliar. En concentración de 2 ppm el desarrollo de callo es menor y el número de hojas inducidas es mayor por lo que se recomienda emplear esta concentración en *Rubus glaucus*.

El AG₃ en 1 ppm parece favorecer el rompimiento de dormancia de yemas de mora en combinación con BAP 2 ppm.

La enlongación del tallo y el enraizamiento de plántulas "*in vitro*" fue promovida por la acción del AIA 0,1 ppm en combinación con BAP 2 ppm y AG₃ 1 ppm.

Habiendo obtenido plántulas de mora óptimas para ser propagadas se recomienda continuar con el proceso de micropropagación para obtención Clonal masiva de plántulas de mora.

Se recomienda utilizar como subexplantes en la micropropagación, segmentos nodales con yema axilar ya que en los primeros ensayos de micropropagación, se ha obtenido éxito con este tipo de subexplante.

Se recomienda continuar con el proceso de endurecimiento y adaptación de plantas a condiciones de exterior.

En el proceso de endurecimiento se recomienda desarrollar una primera etapa en invernadero y evaluar diferentes substratos.

Se recomienda hacer evaluación en laboratorio y en campo del genotipo y el fenotipo de las plantas obtenidas "*in vitro*".

LITERATURA CITADA

1. Babic, V., M. Neskovic. 1984. Propagation of blackberry cultivars from small apical buds **in vitro**.
2. Broome, O. y R. Zimmerman. 1978. **In vitro** propagación of blackberry Hort. Science 13 (2): 151-153.
3. Gebhardt, K. 1985. Development of sterile cultivation sistem for rooting of shoot tip cultures (Red Raspberries) in durosplast foam
4. Harper, O. 1978. Tissue culture propagation of blackberry and tayberry Hort. Res. 18: 141-143.
5. Murashige, T. y F.P. Skoog. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture. Physi ol. Plant 15: 473-497.
6. Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant. Phisiot. 25: 135-66.
7. Melgarejo, J. Modo de acción de los fungicidas. Unión Carbide Colombia. S.A. S.F. Plant Sci. 39: 141-148.
8. Pyott, J.L. y R.H. Converse. 1981. **In vitro** propagation of Heat-treated Red Raspberry clones. Hort. Science 16 (3): 308-309.
9. Welander, M. 1985. **In vitro** culture of Reasberry (*Rubus ideaus*) for mass propagation, J. Hortic. Sci. (4): 493-499.
10. Zimmerman, R.G. y O.C. Galletta. 1980. Propagation of thornless blackberies by one cuttings. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105 (3): 405-407.