

# Propagación *in vitro* de materiales adultos de *Rubus glaucus* Benth

LEIDY YANIRA RACHE CARDENAL\*  
JOSÉ CONSTANTINO PACHECO MALDONADO\*\*

\* Bióloga, Auxiliar de Investigación Laboratorio BIOPLASMA, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Biológicas. E.mail: leidy\_rache@yahoo.com.

\*\* Dr. Biología. Profesor Titular Escuela de Ciencias Biológicas. Director Laboratorio BIOPLASMA-Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

e-mail: jocpach@hotmail.com

## Resumen

En este trabajo se estableció un protocolo para la micropropagación de mora de castilla, utilizando MS como medio de cultivo y como explantes primarios meristemos escindidos de yemas axilares tomadas de plantas adultas. Después del estado I de establecimiento (30 días en MS con BA, GA<sub>3</sub> y AIA en concentración de 2.0, 0.5 y 1.0 mg/L, respectivamente) se cuantificó 74% de meristemos activos. Durante el estado II de proliferación, 52 microtallos desarrollados a partir del cultivo de meristemos se propagaron por segmentos caulinares, obteniéndose una media de 3 microtallos desarrollados por explante cultivado en MS suplementado con 2.0 mg/L de BA más 1.0 mg/L de GA<sub>3</sub> más 0.1 mg/L de AIA. Durante el estado III de enraizamiento, se cuantificó 100% de microtallos enraizados en MS con macroelementos a la mitad de la concentración original suplementado con 2.3 mg/L de AIA y 160 mg/L de phloroglucinol. Finalmente en el estado IV de aclimatización el 85% de las plántulas fueron viables y reactivarón su crecimiento en invernadero.

## Abstract

In this work a protocol for blackberry micropropagation was established, using MS as culture medium and as primary explants meristems of axilar buds taken of adult plants. After establishment phase, 30 days in MS with BA 2.0 mg/L, GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L plus AIA 1.0 mg/L, 74% of active meristems was quantified. During the proliferation phase, 52 developed microshoots coming from meristems were propagated through stem segments, obtaining a proliferation rate of 3 developed microshoots for explant cultured in MS supplemented with 2.0 mg/L of BA plus 1.0 mg/L of GA<sub>3</sub> plus 0.1 mg/L of AIA. During the rooting phase, 100% of rooted shoots was quantified in MS with macroelements reduced to half of original strength supplemented with 2.3 mg/L of AIA plus 160 mg/L of phloroglucinol. Finally, after acclimatization phase 85% of the plantlets was viable and they reactivated its growth in greenhouse.

**Palabras clave:** Mora de Castilla, micropropagación, meristemos, microtallos, cultivo *in vitro*.

**Key words:** Blackberry, micropagation, meristems, shoots, *in vitro* culture.

## Introducción

El concepto original de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se ha extendido para abarcar tanto el cultivo aséptico de tejidos, como el de células y órganos dentro de un grupo de técnicas que se fundamentan en varios principios, entre ellos el de la totipotencialidad celular y la hipótesis del balance hormonal. Con base en estos principios se originaron nuevas técnicas de cultivo de tejidos como micropropagación, organogénesis, embriogénesis, cultivo de protoplastos y anteras, entre otros (Villalobos y Thorpe, 1991).

La micropropagación es una metodología que permite la multiplicación *in vitro* de materiales vegetales estudiando los ciclos naturales de producción de semilla sexual. En sentido estricto, es la propagación clonal de un genotipo seleccionado usando técnicas de cultivo *in vitro*; sin embargo, el término micropropagación se emplea más a menudo asociado con la producción masiva de plantas, a unos precios competitivos (Deberg y Read, 1991). Inicialmente, Murashige (1974) describió tres estados básicos para la micropropagación; actualmente se acepta que existen cinco estados (0 a IV) críticos para una micropropagación exitosa.

Estado 0. Selección y preparación de la planta madre: durante este estado las plantas madre son mantenidas en condiciones de limpieza en ambientes controlados para activar el crecimiento pero reduciendo la presencia o riesgo de enfermedades. Existen numerosos procedimientos para mantener las plantas

madre libres de patógenos y para incrementar la reactividad del explante.

Estado I. Establecimiento de cultivos asépticos: en esta etapa se seleccionan los explantes más aconsejables, los cuales deben ser desinfectados superficialmente, dado que en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que compiten ventajosamente con el explante. Para los procesos de desinfección se han utilizado diferentes compuestos; los más comunes son las soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, peróxido de hidrógeno, nitrato de plata, alcohol y cloro comercial. El método de desinfección y la concentración del producto que se utilice se determinan según las características del explante y por ensayo y error (Villalobos y Thorpe, 1991).

Estado II. Proliferación: se caracteriza por una repetida formación de yemas axilares en los explantes cultivados en medios suplementados con concentraciones relativamente altas de citoquininas, las cuales, además de inhibir la dominancia apical, promueven la división y diferenciación celular.

Estado III. Enraizamiento. Se caracteriza por la preparación de las yemas desarrolladas (microtallos o brotes) producidas en el estado II para una exitosa transferencia al suelo. Este estado comprende elongación de los brotes o microtallos con miras al enraizamiento. Generalmente, el enraizamiento se realiza mediante transferencia a un medio de cultivo con menor concentración de sales. Además el enraizamiento requiere un cambio en el balance hormonal, esto es, disminuir en el medio

de cultivo las citoquininas y aumentar las auxinas (Villalobos y Thorpe, 1991).

**Estado IV. Aclimatización:** Implica el endurecimiento de plántulas en invernadero en condiciones de baja humedad relativa y una alta intensidad de luz. Las plántulas regeneradas se pueden transplantar directamente o realizando una paulatina adaptación a condiciones de invernadero.

El método más comúnmente utilizado para propagación comercial es la multiplicación de yemas axilares a partir de cultivo de meristemos; este método proporciona estabilidad genética a los explantes y es aplicable a numerosas especies. Los meristemos son tejidos vegetales formados por células indiferenciadas que están en continuo estado de división. Mediante el cultivo de meristemos se pueden regenerar plantas libres de patógenos y enfermedades virales (Izco y Barreno, 1997).

Cuando se realiza multiplicación a partir de explantes que contengan meristemos apicales o axilares se puede obtener, mantener y multiplicar los materiales seleccionados, pudiéndose en algunos casos, regenerar una sola planta, y en otros casos estimular la formación de múltiples brotes (Krikorian, 1991).

De otro lado, la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) es un frutal de clima frío, de gran importancia económica e industrial en el mercado nacional e internacional, principalmente por el sabor, apariencia y calidad de sus frutos, los cuales son utilizados en la industria de jugos, mermeladas, repostería, yogures y para consumo como fruta fresca (Hernández, et al., 1999; Martínez, et al., 2005). Por esta razón, se ha incrementado el interés por desarrollar nuevas tecnologías que permitan elevar la productividad de los cultivos, algunas relacionadas con la aplicación y desarrollo de técnicas *in vitro* tales como embriogénesis somática (Martínez, et al., 2005) y micropagación (Hernández, et al., 1999;

Fernández y Miller 1994; Converse, 1981 y Ramírez, 1989), técnicas y procedimientos que tienen como fin ofrecer alternativas para la propagación de plantas de mora, aumentando la productividad y/o rendimiento de los materiales vegetales regenerados y la calidad de los frutos desarrollados, entre otras.

Cuando la propagación de la mora se realiza por semilla sexual los porcentajes de regeneración son muy bajos y demorados y además, se presenta alta variabilidad fenotípica. Tradicionalmente la mora se propaga vegetativamente por acodo y por estaca; estos sistemas de propagación presentan algunos problemas reproductivos y no garantizan la sanidad de las nuevas plantas (Martínez et al., 2005 y Hernández et al., 1999). Una de las alternativas para establecer cultivos con características genéticamente estables es la micropagación de individuos seleccionados, a través de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Bernal, 1986). En este trabajo se establece un protocolo de micropagación, utilizando como explantes primarios yemas axilares tomadas de plantas adultas seleccionadas, con miras a la producción de materiales vegetativos para el establecimiento de huertos comerciales.

## Materiales y métodos

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales -BIOPLASMA- de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

### Estado 0. Selección y preparación de la planta madre

Las plantas adultas seleccionadas se encuentran ubicadas en el municipio de Arcabuco (Boyacá); se caracterizan por una alta productividad con frutos de buen tamaño. De estas plantas se tomaron estacas de 6 cm de longitud con yemas axilares en reposo, se humedecieron y se colocaron en bolsas plásticas para su transporte al laboratorio.

## Estado 1. Establecimiento de cultivos asépticos

En el laboratorio, de las estacas se obtuvieron microestacas de 2 cm, con una yema axilar. Las microestacas se sometieron al siguiente proceso de asepsia superficial: un enjuague con jabón detergente y agua corriente; en cámara de flujo laminar, inmersión en etanol al 50% durante 3 minutos; inmersión en hipoclorito comercial ( $\text{NaOCl}$ ) al 10% (v/v) más Tween 20 durante 5 minutos. Finalmente 4 enjuagues con agua destilada estéril durante 2 minutos cada uno. De las yemas axilares se eliminaron todos los tejidos foliares y los meristemos acompañados

de dos primordios se escindieron y se cultivaron (84 meristemos) en medio MS (Murashige y Skoog, 1962, tabla 1) suplementado con: BA (2.0 mg/L) + AIA (1.0 mg/L) + GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L) ó con BA (1.0 mg/L) + AIA (0.5 mg/L) + GA<sub>3</sub> (0.2 mg/L).

Después de 30 días de cultivo se evaluó la efectividad del protocolo de asepsia superficial para el establecimiento *in vitro* de meristemos, la viabilidad de los tejidos meristemáticos y el efecto de los reguladores de crecimiento adicionados a los medios de cultivo sobre la reactivación de la actividad meristemática.

**Tabla 1. Medios para establecimiento de meristemos, multiplicación y enraizamiento de microtallos de mora de castilla**

Componentes	Establecimiento*	Multiplicación*	Enraizamiento*
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	1650	825
$\text{KNO}_3$	1900	1900	950
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	170	85
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	440	220
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	370	185
KI	0.83	0.83	0.83
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2	6.2	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	22.3	22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	8.6	8.6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.25	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	27.8	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	37.3	37.3
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.025
Tiamina-HCl	0.1	0.1	0.1
Piridoxina-HCl	0.5	0.5	0.5
Ácido Nicotínico	0.5	0.5	0.5
Mio-Inositol	100	100	100
Sacarosa	30.000	30.000	30.000
Agar	7000	7000	7000
Ph	5.8	5.8	5.8
Ácido ascórbico	100	-	-

Medio base MS: Murashige y Skoog, (1962); \* Concentración en mg/L

**Condiciones generales de cultivo.** El pH de todos los medios de cultivo utilizados se ajustó a 5.6 con KOH y/o HCl (0.5 – 1.0 N) y se esterilizaron en autoclave a 15 psi, 121 °C durante 20 minutos. Los cultivos se mantuvieron en cuarto de incubación a 24 ± 1°C, con iluminación continua suministrada por lámparas fluorescentes SILVANA, luz día de 75 W con intensidad lumínica de 70-80 imol.m<sup>-2</sup>/s.

### Estado II. Proliferación de yemas axilares.

Después del periodo de establecimiento 52 meristemos viables que reactivaron su actividad meristemática, fueron transferidos durante 30 días a MS suplementado con diferentes reguladores de crecimiento como se indica en la tabla 2. Posteriormente de los microtallos desarrollados se obtuvieron segmentos caulinares de 2.0 a 3.0 cms (4 yemas axilares en promedio) y se subcultivaron 63 explantes en MS con los reguladores indicados en los tratamientos 2, 3 y 5 de la tabla 2.

En esta etapa se evaluó el efecto de los reguladores de crecimiento sobre el número y longitud de los microtallos obtenidos de los meristemos en el primer subcultivo y de los segmentos caulinares en el segundo subcultivo.

**Tabla 2. Reguladores de crecimiento utilizados para inducir desarrollo de microtallos**

Tratamiento (Tto)	Reguladores de crecimiento (mg/L)		
	BA	GA <sub>3</sub>	AIA
1	2.0	1.0	-
2	2.0	1.0	0.1
3	1.0	0.5	-
4	1.0	0.5	0.1
5	0.5	0.5	-

### Estado III. Enraizamiento

En la etapa de enraizamiento, microtallos de 2.5 a 3.0 cm de longitud fueron cultivados en MS con macroelementos reducidos a la mitad de la concentración original (tabla 1), suplementado con phloroglucinol y auxinas como se indica en la tabla 3. Al final de esta etapa se cuantificó el porcentaje de microtallos enraizados, el efecto del AIA, AIB y phloroglucinol en el desarrollo radicular, la apariencia del sistema radicular y el desarrollo de raíces primarias y secundarias.

**Tabla 3. Reguladores de crecimiento utilizados para enraizamiento de microtallos de mora de castilla**

Trata-miento	Reguladores de crecimiento (mg/L)		
	AIB	PhL	AIA
T1	2	-	-
T2	-	160	-
T3	2	160	-
T4	-	-	2.3
T5	-	160	2.3

### Estado IV. Aclimatización

Para el endurecimiento, las plántulas obtenidas *in vitro* se removieron de los recipientes de cultivo, las raíces se enjuagaron con agua corriente y se transfirieron en un sustrato compuesto por tierra, arena y cascarilla en proporción 1:1:1. Las plántulas se mantuvieron en invernadero con riego por nebulización cada 6 horas durante 2 semanas; posteriormente el riego se disminuyó progresivamente. En esta etapa se cuantificó el número de plántulas aclimatizadas que reactivaron su crecimiento.

Los datos obtenidos en los ensayos para determinar el efecto de los reguladores de crecimiento y su concentración, sobre la

viabilidad, actividad meristemática, crecimiento y desarrollo de microtallos y raíces, así como los obtenidos durante la aclimatización de plántulas, fueron tabulados y presentados en forma de porcentajes y promedios con sus desviaciones estándar.

## Resultados y discusión

### Estado 1. Establecimiento de cultivos asépticos

El proceso de asepsia superficial de microestacas utilizado fue efectivo para el establecimiento *in vitro* de meristemos viables, cuantificándose (tabla 4) porcentajes relativamente bajos de contaminación, 21 y 24%, tratamientos 1 y 2 respectivamente. En otros trabajos de micropagación de mora Hernández et al., (1999) durante la etapa de establecimiento de yemas, utilizaron 100 mg/L de ácido ascórbico en el medio de cultivo observándose un buen control de procesos oxidativos; sin embargo, en este trabajo, la adición de la misma cantidad de ácido ascórbico al medio de establecimiento, no fue efectivo para controlar la necrosis de tejidos, cuantificándose 26% de explantes necróticos cuando los meristemos se cultivaron en MS suplementado con 2.0 mg/L de BA más 1.0 mg/L de AIA más 0.5 mg/L de GA<sub>3</sub> (T1), mientras que cuando se cultivaron en MS con 1.0 mg/L de BA más 0.5 mg/L de AIA más 0.2 mg/L de GA<sub>3</sub> se cuantificó un 5% (T2, tabla 4). Estas respuestas pueden ser atribuidas a la con-

centración de los reguladores de crecimiento utilizados; evidenciándose que altas concentraciones de BA, AIA y GA<sub>3</sub> producen oxidación de tejidos y necrosis de explantes. Se debe tener en cuenta, según Ramírez (1989), Gaviria y Castro (1993), Fernández y Miller (1994) y Hernández et al., (1999), que los procesos de necrosis de tejidos también pueden ser provocados por lesiones causadas a los tejidos durante su manipulación, por no utilizar como fuente de explantes plantas jóvenes y/o por no manipular los explantes en presencia de soluciones reductoras (ácido cítrico, ácido ascórbico).

El medio más efectivo para reactivar la actividad meristemática durante el establecimiento *in vitro* fue el suplementado con 1 mg/L de BA, más 0.2 mg/L de AIA, más 0.2 mg/L de GA<sub>3</sub> (T2), cuantificándose el mayor porcentaje, 74%, de meristemos activos y menor porcentaje, 60%, de explantes con callo basal; mientras que en el medio suplementado con 2 mg/L de BA, más 1 mg/L de AIA, más 0.5 mg/L de GA<sub>3</sub> (T1), el porcentaje de meristemos activos fue menor, 50%, y el porcentaje de explantes con callo mayor, 100% (tabla 4). Estos datos no concuerdan con los reportados por Hernández et al., (1999), Pyott y Converse (1981), Skirvin et al., (1981) y Ramírez (1989), quienes indican que una concentración de 2.0 mg/L de BA en combinación con 0.5 mg/L de GA<sub>3</sub> y 1.0 mg/L de AIA producen un buen desarrollo de las yemas de mora y un promedio mayor de hojas desarrolladas después de 30 días de cultivo.

**Tabla 4. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre la reactivación de la actividad meristemática durante la etapa de establecimiento**

RC (mg/L)	MA (%)	Explantes con callo basal (%)	Contaminación (%)	Necrosis (%)
BA + AIA + GA <sub>3</sub> 2.0 + 1.0 + 0.5	50	100	21	26
BA + AIA + GA <sub>3</sub> 1.0 + 0.5 + 0.2	74	60	24	5

RC: Reguladores de crecimiento; MA: Meristemos activos.

## Estado II. Proliferación de yemas axilares

Durante esta etapa, las mayores longitudes medias 2.5 y 1.9 cm y número de microtallos 19 y 14, se cuantificaron al subcultivar (primer subcultivo) los explantes en MS suplementado con BA, GA<sub>3</sub> y AIA en concentraciones de 2.0 1.0 y 0.1 mg/L respectivamente (T2) y en MS suplementado con BA, GA<sub>3</sub> en concentraciones de 1.0 y 0.5 mg/L respectivamente (T3) (tabla 5). Estos resultados muestran que, teniendo en cuenta las concentraciones de reguladores utilizadas durante la etapa de establecimiento, para estimular el desarrollo de microtallos es necesario aumentar la concentración de citoquinina y giberelina y disminuir la de auxina, o, como recomienda Hernández et al., (1999), no utilizar nuevamente la auxina

Durante el segundo subcultivo de segmentos caulinares se observó que el MS suplementado con BA y GA<sub>3</sub> en concentraciones de 1.0 y 0.5 mg/L (T3) fue el más efectivo, cuantificándose la media más alta, 3, de microtallos desarrollados y el menor porcentaje 76%, de explantes con callo. Además el 48% de los explantes cultivados en este medio presentaron tallos gruesos y vigorosos (tabla 5).

## Estado III. Enraizamiento

En la figura 1, se muestra el efecto del phloroglucinol y las auxinas AIA y AIB sobre el desarrollo radical en microtallos de mora. Aunque se ha confirmado la acción del phloroglucinol como promotor de enraizamiento en genotipos de *Strawberry* y

Tabla 5. Efecto del BA, AIA y GA<sub>3</sub> sobre la proliferación y desarrollo de microtallos.

Tto	RC (mg/L)	Primer Subcultivo		Segundo subcultivo			
		Microtallos Longitud (cm) $\bar{X} \pm DS$ .	X	Microtallos Longitud (cm) $\bar{X} \pm DS$ .	Raíz	Callo	Tallo Grueso
1	BA + GA3 2.0 + 1.0	1.9 ± 0.83	-	-	-	-	-
2	BA + GA3 + AIA 2.0 + 1.0 + 0.1	2.5 ± 0.9	2.1	1.4 ± 0.53	10	100	5
3	BA + GA3 1.0 + 0.5	1.9 ± 0.52	3.0	1.8 ± 0.35	0	76	48
4	BA + GA3 + AIA 1.0 + 0.5 + 0.1	1.5 ± 0.34	-	-	-	-	-
5	BA + GA3 0.5 + 0.5	-	2.1	1.2 ± 0.43	0	86	43

Tto: tratamiento; RC: Reguladores de crecimiento; ± DS: Desviación estándar.

durante la etapa de multiplicación si ésta ha sido utilizada en la etapa de establecimiento. Sin embargo, estos datos no concuerdan con los obtenidos por Hernández et al., (1999) quienes utilizando MS suplementado con 2.0 mg/L de BAP y 1.0 mg/L de GA<sub>3</sub> obtuvieron el mayor promedio de microtallos en cultivos de mora al cabo de 30 días.

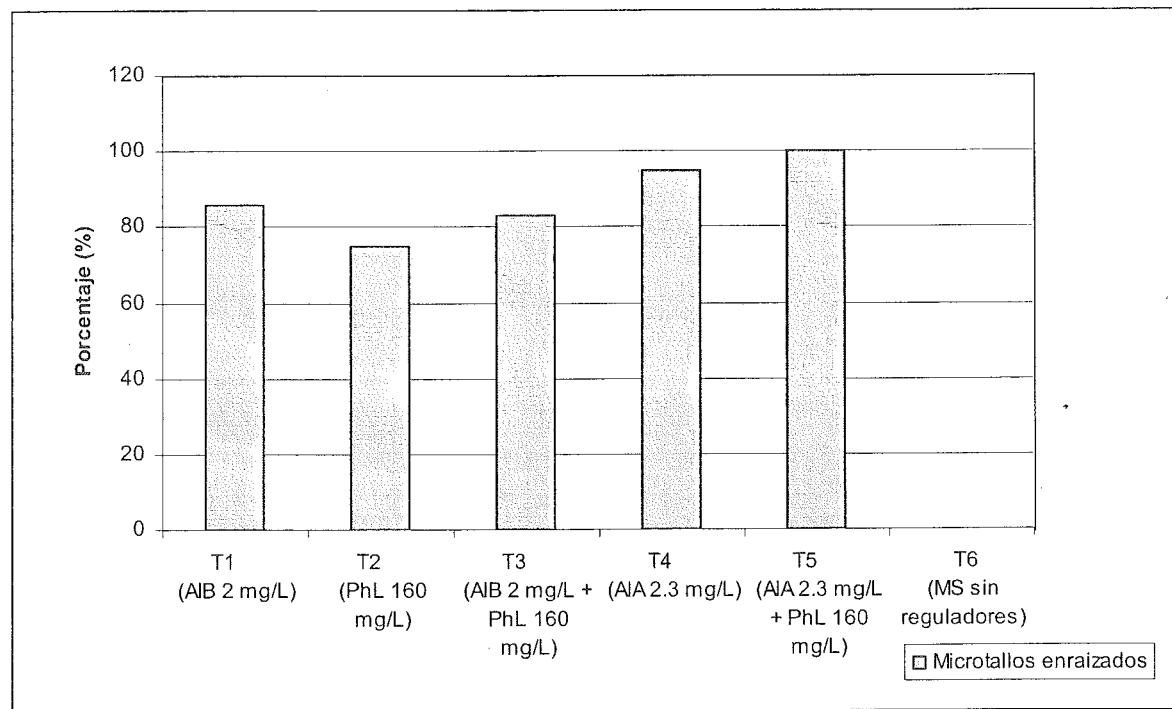
*Rubus* al combinarlo con AIB (James, 1979; Sobczykiewicz, 1978, citados por George, 1993), en este trabajo, después de 30 días de cultivo, el porcentaje de enraizamiento más alto, 100%, se cuantificó en microtallos cultivados en MS con macroelementos a la mitad de la concentración original suplementado con 2.3 mg/L de AIA y 160 mg/L de phloroglucinol

(T5), seguido por 95% en microtallos cultivados en medio con 2.3 mg/L de AIA (T4) y 86% en medio con 2 mg/L de AIB (T1). En medio sin reguladores los microtallos no enraizaron. Sin embargo, en los tratamientos 4 y 5 las plántulas presentaron raíces escasas y de menor longitud, mientras los microtallos en medio con 2 mg/L de AIB (T1), desarrollaron raíces primarias y secundarias abundantes de mayor longitud comparadas con las desarrolladas en los demás tratamientos. Estos datos no concuerdan con lo reportado por Hernández et al., (1999), quienes cuantificaron un mayor desarrollo radicular y apariencia de las raíces (raíces alargadas, blancas y bien ancladas en la

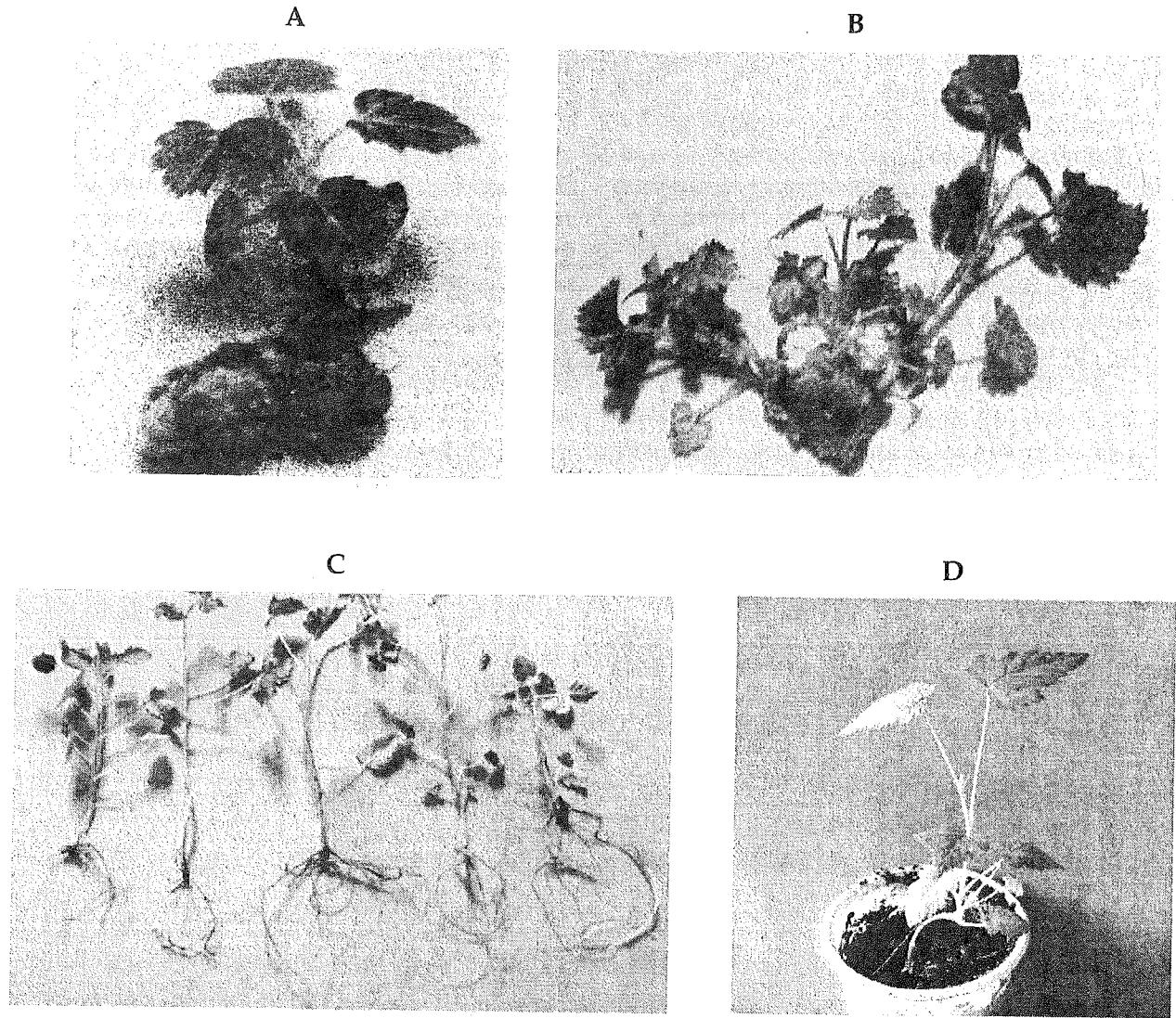
base del tallo) cuando adicionaron al medio 2 mg/L de AIA.

#### Estado IV. Aclimatización

Durante el endurecimiento de plántulas se cuantificó 85% de plántulas viables que reactivaron su crecimiento; datos similares obtuvieron Martínez, et al., (2005) y Hernández et al., (1999) utilizando como sustrato tierra, arena y escoria en proporción 1:1:1 y tierra, arena y vermiculita en proporción 1:1:1. En la figura 2, se muestra el proceso de microporpagación de mora a partir del cultivo de meristemos.



**Figura 1.** Efecto del phloroglucinol, AIA y AIB sobre la inducción y desarrollo radical de microtallos de mora de castilla.



**Figura 2.** Micropropagación de Mora. A. Microtallo en desarrollo. B. Microtallos en proliferación. C. Microtallos enraizados. D. Plántula aclimatizada.

## Bibliografía

- A.D. Krikorian (1991). Propagación clonal *in vitro*. En: W. Roca, L. Mroginski (Eds.) Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT, Centro internacional de Agricultura Tropical. Editorial XYZ. Cali, Colombia. pp. 95-124.
- B.M. Gaviria y D. Castro (1993). Aplicación de la técnica de cultivo *in vitro* de la mora. Seminario taller "La biotecnología vegetal: una herramienta a nuestro alcance". Universidad Católica de Oriente. Rionegro, Antioquia. 12 p.
- C.A. Hernández, M.E. Lopera, B.E. Mora y J.F. Cárdenas (1999). Desarrollo de un protocolo para la propagación masiva de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Bent) mediante la utilización del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Actualidades Biológicas. 21 (70): 3 - 12.
- Del C.A. Ramírez (1989). Estudios preliminares para la propagación clonal *in vitro* de mora (*Rubus glaucus*). Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá, tesis de maestría. 134 p.
- E. George (1993-1996). Plant propagation by tissue culture. In practice. England: Exegetics, Easter Press, Part 2. 786 p.
- G.A Fernández y H.A. Miller (1994). Multiplicación *in vitro* de mora (*Rubus glaucus*) a partir de yemas. Universidad del Quindío, tesis de grado. 72 p.
- J. Bernal (1986). La Uchuva (*Physalis peruviana* L.) historia, taxonomía y biología. Memorias Primer Curso Nacional de Uchuva. Tunja.
- J. Izco y E. Barreno (1997). Caracteres taxonómicos. Morfología y anatomía de órganos vegetativos. En: J. Izco, E. Barreno, M. Costa, J. Devesa, et al., Botánica. España. Interamericana McGraw Hill. 781 p.
- J.L. Pyott y R.H. Converse (1981). *In vitro* propagation of heat treated red raspberry clones. Hort. Sci. 16: 308-309.
- M.A. Martínez, A. Solano y J. Pacheco (2005). Algunos factores que afectan la embriogénesis somática en tejidos juveniles de *Rubus glaucus* Benth. Rev. Asoc. Col. Ciencias Biol. (Col.). 17: 95-107.
- R.H. Converse (1981). Relationship of prior heat treatment of growth and fruiting of "Thornless Oregon Evergreen" blackberry. Hort. Sci. 16: 312-313.
- R.M. Skirvin, M.C. Chu, E. Gómez (1981). *In vitro* propagation of thornless training blackberries. Hort. Sci. 16: 310-312.
- T. Murashige (1974). Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 135-166.
- T. Murashige y P. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15 (3): 473-497.
- V. Villalobos y T. Torpe (1991). Micropagación: conceptos metodología y resultados. En: W. Roca y L. Mroginski (Eds.) Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical. Editorial XYZ, Cali, Colombia. pp. 127-142.