

Regeneración y enraizamiento de brotes adventicios etiolados de cultivares de zarzamora (*Rubus* sp.)

Regeneration and rooting of etiolated adventitious shoots of blackberry (*Rubus* sp.) cultivars

Carlos Eduardo Millones Chanamé^{1*} y Ernestina Rosario Vásquez Castro²

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the etiolated adventitious shoot regeneration for the development of an *in vitro* propagation protocol of three *Rubus* sp. cultivars. Zygotic embryos were extracted from botanical seeds of *Rubus* sp. cultivars and placed in establishment culture medium. After 90 days of *in vitro* culture, the seedlings were conditioned to obtain the basal stem segments and placed in growth and development culture media, they were then subjected to periods of darkness for etiolated adventitious shoot regeneration. Afterwards, the nodal segments were transferred to rooting culture media. Results showed that the regeneration of adventitious shoots from *Rubus* sp. cultivars was on average eight days. Likewise, the sectioned nodal segments of the adventitious shoots induced roots when the medium contained the combination of the auxins NAA and IBA. The regeneration of etiolated adventitious shoots in the three cultivars of *Rubus* sp. allowed to obtain elongated shoots in a short time and without the use of growth regulators, facilitating the *in vitro* propagation of this species.

Keywords: *Rubus*, regeneration, propagation, darkness.

Resumen

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la regeneración de brotes adventicios etiolados para el desarrollo de un protocolo de la propagación *in vitro* de tres cultivares de *Rubus* sp. Embriones cigóticos fueron extraídos de semillas botánicas de los cultivares de *Rubus* sp. y colocados en medio de cultivo de establecimiento. A los 90 días de cultivo *in vitro* las plántulas fueron acondicionadas para obtener los segmentos basales caulinares y colocadas en medios de crecimiento y desarrollo, luego fueron sometidos a periodos de oscuridad para la regeneración de brotes adventicios etiolados. Posteriormente, los segmentos nodales fueron transferidos en medios de cultivo de enraizamiento. Los resultados mostraron que la regeneración de los brotes adventicios en los cultivares de *Rubus* sp. fue en promedio de ocho días, asimismo, los segmentos nodales seccionados de los brotes adventicios indujeron raíces cuando el medio contenía la combinación de las auxinas ANA y AIB. La regeneración de brotes adventicios etiolados en los tres cultivares de *Rubus* sp. permitió obtener brotes elongados en corto tiempo y sin el empleo de reguladores de crecimiento, facilitando la propagación *in vitro* de esta especie.

Palabras clave: *Rubus*, regeneración, propagación, oscuridad.

Recibido: 18/04/2020

Aceptado: 06/09/2020

Publicado: 01/10/2020

Sección: Artículo original

*Autor correspondiente: carlos.millones@untrm.edu.pe

Introducción

Rubus es uno de los géneros más diversos que pertenece a la familia Rosaceae, posee alrededor de 750 especies distribuidas en todos los continentes, excepto la Antártida (Alice y Campbell, 1999). Actualmente, la propagación *in vitro* de *Rubus* sp. es considerada una alternativa viable, con la finalidad de obtener plantas libres de virus, uniformidad genética y en menor tiempo (Clark y Finn, 2014).

Es así, que especies de *Rubus* son propagadas *in vitro* empleando explantes como segmentos nodales (Ayub *et al.*, 2019; Da Silva *et al.*, 2016; Hunková *et al.*, 2016; Pérez-Martínez y Castañeda-Garzón, 2016), brotes (Hunková *et al.*, 2016, 2018), y estacas de tallo con yemas dormantes (Gajdošová *et al.*, 2015).

Asimismo, los reguladores de crecimiento empleados para inducir una respuesta morfogénica en explantes de

Rubus incluye a citocininas y auxinas (Bueno *et al.*, 2018), citocininas y giberelinas (Cancino-Escalante *et al.*, 2015; Millones, 2018; Pérez-Martínez Castañeda-Garzón, 2016). Además, para la elongación de los brotes de *R. ideaus* ha sido empleado brasinolido, hormona vegetal de tipo esteroide (Robres-Torres *et al.*, 2015).

Por otro lado, la regeneración y elongación de

¹Departamento Académico de Educación, Ciencias de la Comunicación y Ciencias Básicas, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Perú. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7236-6341>.

²Departamento Académico de Educación, Ciencias de la Comunicación y Ciencias Básicas, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Perú. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2106-7840>.

How to cite: Millones Chanamé, C.E. y Vásquez Castro, E.R. (2020). Regeneración y enraizamiento de brotes adventicios etiolados de cultivares de zarzamora (*Rubus* sp.). *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 22(4), 338–342. DOI: <https://doi.org/10.18271/ria.2020.195>.



brotos adventicios etiolados *in vitro*, proporciona un eficiente sistema para la multiplicación de especies de importancia económica, por lo cual ha sido utilizada en la propagación *in vitro*, a partir de segmentos de hipocótilos, de *Solanum melongena* (Muktadir *et al.*, 2016), y *Ricinus communis* (Zhang *et al.*, 2016). Por lo antes indicado, la presente investigación, tuvo como objetivo evaluar la regeneración de brotes adventicios etiolados para el desarrollo de un protocolo de propagación *in vitro* de los cultivares Castilla, Tupy y Navaho *Rubus* sp.

Material y métodos

El material vegetal estuvo constituido por semillas botánicas de *Rubus* sp. cultivares Castilla, Tupy y Navaho. Para la obtención de segmentos basales caulinares, las semillas fueron desinfectadas con HgCl_2 0,1% más 4 gotas de Tween20 por 15 minutos, posteriormente con ayuda de un estereoscopio fueron extraídos los embriones y colocados en tubos de ensayo con medio de establecimiento (Millones, 2018), suplementado con 150 mg/L de ácido ascórbico, 0,1 mg/L de ácido giberélico (AG_3), 0,04 mg/L de 6-furfurilaminopurina (KIN), phytigel Sigma 0,15%, y pH ajustado a 5,8. Los embriones fueron incubados en cámara de crecimiento a 24 °C, fotoperiodo 16/8h irradiación $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Plántulas de *Rubus* sp. germinadas fueron subcultivadas a medio de crecimiento y desarrollo a base de las sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con mio-inositol 100 mg/L, sacarosa 3%, 18 mL/L de buffer fosfato, ácido ascórbico 150 mg/L y phytigel Sigma 0,15%, pH ajustado a 5,8.

En la regeneración de brotes adventicios etiolados, se emplearon las plántulas establecidas en la etapa anterior, con longitud de brotes de 60-70 mm y 90 días de cultivo.

El primer tratamiento de etiolación consistió en escindir los 2/3 del brote aéreo, poda de raíz y escisión de los limbos foliares. Posteriormente, los segmentos basales caulinares fueron colocados en recipientes con medio de crecimiento y desarrollo, envueltos con papel aluminio, colocados en cámara de crecimiento a 24°C, y sometidas a la primera etiolación por once días (1° etiolación). Posteriormente, los brotes adventicios etiolados regenerados fueron colocados en fotoperiodo 16/8h durante siete días. Las secciones nodales obtenidas fueron colocadas en medios de cultivo de enraizamiento, a base de las sales y vitaminas MS, mio-inositol 100mg/L, sacarosa 3%, ácido ascórbico 150 mg/L, buffer fosfato 18 mL/L, phytigel Sigma 0,15%, carbón activado 0,3%, y suplementado con 1 mg/L de ácido indolbutírico (AIB) y 1 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) más 2 mg/L de AIB.

El segundo tratamiento de etiolación, consistió en colocar nuevamente las secciones basales caulinares (con brotes aéreos escindidos) de la primera cosecha de brotes etiolados en medios de crecimiento y desarrollo y sometido a etiolación por seis días (2° etiolación), siete días de fotoperiodo, y en el día 13 de cultivo las secciones nodales fueron colocados en medio de enraizamiento. Por último, se utilizó un control en cada cultivar que no fue expuesto a periodos de etiolación.

El análisis de datos de la respuesta morfológica en los segmentos basales caulinares de los cultivares de

Rubus sp. fue un diseño completamente al azar con tres repeticiones y cinco submuestras, las medias fueron comparadas utilizando la prueba Tukey 0,05% de nivel de significación. Para el análisis de datos de la respuesta morfológica en los segmentos basales caulinares en cada cultivar de *Rubus* sp. versus el control, y el efecto de los reguladores de crecimiento ANA y AIB en la inducción de raíces adventicias de brotes de *Rubus* sp., se empleó la prueba t de dos medias con 0,05% de nivel de significación con 15 repeticiones. Los datos de las variables número de brotes, número de yemas por brote y número de raíces, fueron transformados mediante la $\sqrt{Y+0,5}$ antes de someterlos al ANVA y/o prueba t. Todos los datos fueron procesados empleando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) for Windows V8.

Resultados

Los embriones de los cultivares Castilla, Tupy y Navaho germinaron a los nueve días de instalados *in vitro* (Figura 1a y 1b), y las plántulas después de un periodo de 90 días de cultivo alcanzaron una longitud entre 60 a 70 mm (Figura 1c y d), y posteriormente fueron acondicionadas para la obtención de segmentos basales caulinares para la inducción de brotes adventicios etiolados (Figura 1e, f y g).

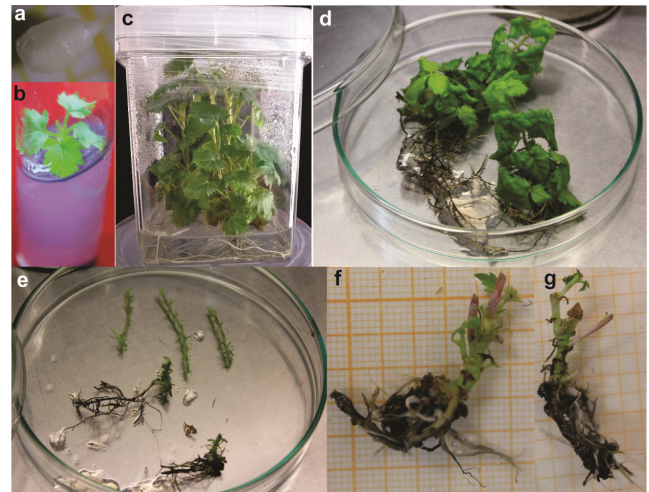


Figura 1. Obtención de segmentos basales caulinares en cultivares de *Rubus* sp. a) Embrión de *Rubus* sp. b) Crecimiento y desarrollo del embrión en medio de establecimiento. c y d) Plántulas de *Rubus* sp. después de 90 días de cultivo *in vitro*. e) Preparación de secciones basales caulinares de *Rubus* sp. f) y g) Segmentos basales caulinares preparados para la regeneración de brotes adventicios etiolados.

La respuesta morfológica de los segmentos basales caulinares sometidos a oscuridad entre los cultivares de *Rubus* se muestra en la Tabla 1. En el primer tratamiento de oscuridad durante once días no se registraron diferencias significativas en la respuesta morfológica en los tres cultivares, obteniendo valores de longitud de brote que osciló entre 28,9 a 34,3 mm, número de brotes 1,8 a 2,1 y número de yemas por brote 1,2 a 1,4. Igualmente, los segmentos basales caulinares sometidos a un segundo tratamiento de oscuridad durante seis días no mostraron diferencias significativas en las variables evaluadas, registrándose longitud de brote entre 17,6 a 26,5 mm, número de brotes 1,8 a 2,1 y número de yemas por brote 1,1 a 1,7.

Tabla 1. Respuestas morfológicas de los segmentos basales caulinares entre cultivares de *Rubus* sp. Castilla, Tupy y Navaho sometidos a tratamiento de oscuridad por periodos de 11 días (primera etiolación) y 6 días (segunda etiolación)..

Respuestas morfológicas				
Cultivar	Tratam. de oscuridad (días)	Long. de brote (mm) ¹	Núm. de brotes	Núm. de yema/brote ¹
Castilla	11	28,9 ± 11,2 a	1,8 ± 0,6 a	1,4 ± 0,5 a
Tupy	11	30,8 ± 9,8 a	2,0 ± 0,4 a	1,2 ± 0,4 a
Navaho	11	34,3 ± 8,9 a	2,1 ± 0,6 a	1,4 ± 0,7 a
Castilla	6	17,6 ± 6,1 a	1,8 ± 0,7 a	1,5 ± 0,7 a
Tupy	6	26,5 ± 9,1 a	2,1 ± 0,3 a	1,1 ± 0,3 a
Navaho	6	22,0 ± 6,0 a	2,1 ± 0,6 a	1,7 ± 0,8 a

¹ Medias con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre cada una de los cultivares de *Rubus* sp. en la primera y segunda etiolación para $p \leq 0,05$ de acuerdo con la prueba Tukey.

Por otro lado, los segmentos nodales en medio de crecimiento y desarrollo sin tratamiento de oscuridad registraron longitud de brotes, a los 21 días de cultivo, en los cultivares Castilla 12,6 ± 2,9 mm, Tupy 12,7 ± 2,1 mm y Navaho 10,6 ± 3,6 mm, siendo estas longitudes menores respecto a los brotes adventicios etiolados, siendo la prueba significativa (Figura 2). Además, estas plántulas mostraron una apariencia arrosada que no permitió la adecuada multiplicación a partir de segmentos nodales, respuesta mejorada con los brotes adventicios etiolados, los que mostraron alargamiento de entrenudos, facilitando la propagación *in vitro* de esta especie (Figura 3a, 3b, 3c y 3d).

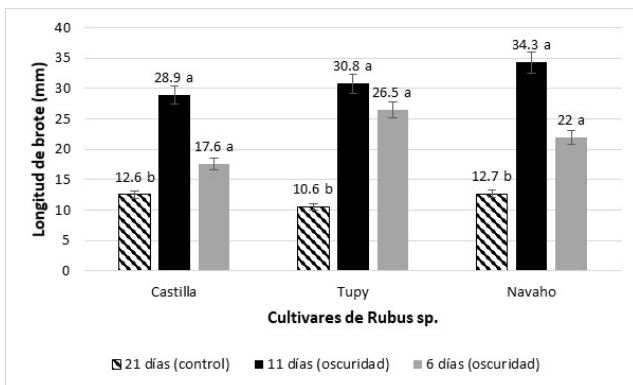


Figura 2. Efecto de los regímenes de luz y oscuridad versus el tratamiento sin oscuridad (control) sobre la longitud de brotes de los segmentos basales caulinares en cultivares de *Rubus* sp. Castilla, Tupy y Navaho. Medias en cada columna con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre cada uno de los cultivares de *Rubus* sp. para $p \leq 0,05$ de acuerdo con la prueba t.

Las respuestas morfológicas dentro de los cultivares de *Rubus* se muestra en la Tabla 1, cuyas medias en dos periodos de oscuridad (11 y 6 días), no registraron diferencias significativas en las variables evaluadas.

Tabla 2. Respuestas morfológicas de los segmentos basales caulinares entre cultivares de *Rubus* sp. Castilla, Tupy y Navaho sometidos a tratamiento de oscuridad por periodos de 11 días (primera etiolación) y 6 días (segunda etiolación)..

Cultivar versus periodo de oscuridad	Long. de brote (mm) ¹	Núm. de brotes ¹	Núm. de yema/brote ¹
Castilla 11 días	28,9 ± 11,2 a	1,8 ± 0,6 a	1,4 ± 0,5 a
Castilla 06 días	17,6 ± 6,1 a	1,8 ± 0,7 a	1,5 ± 0,7 a
Tupy 11 días	30,8 ± 9,8 a	2,0 ± 0,4 a	1,2 ± 0,4 a
Tupy 06 días	26,5 ± 9,1 a	2,1 ± 0,3 a	1,1 ± 0,3 a
Navaho 11 días	34,3 ± 8,9 a	2,1 ± 0,6 a	1,4 ± 0,7 a
Navaho 06 días	22,0 ± 6,0 a	2,1 ± 0,6 a	1,7 ± 0,8 a

¹ Medias con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre cada una de los cultivares de *Rubus* sp. en la primera y segunda etiolación para $p \leq 0,05$ de acuerdo con la prueba t.

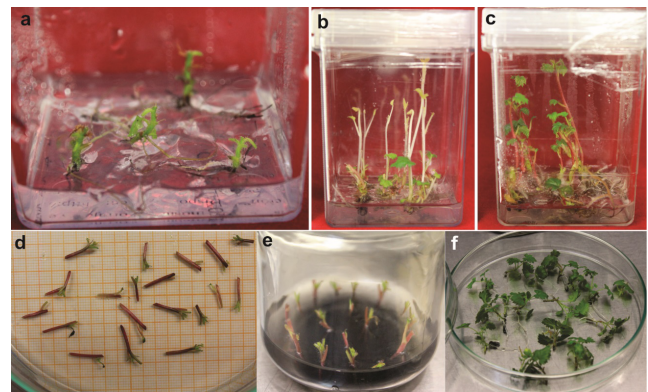


Figura 3. Regeneración de brotes adventicios etiolados. a) Segmentos basales caulinares de *Rubus* sp. b) Regeneración de brotes adventicios etiolados. c) Brotes adventicios etiolados después de 7 días de exposición a fotoperiodo 16/8h. d y e) Brotes nodales en medio de enraizamiento y f) Segmentos nodales con raíces adventicias después de cuatro semanas.

Tabla 3. Respuestas morfológicas en la inducción de raíces adventicias *in vitro* de secciones nodales de *Rubus* sp. cultivares Castilla, Tupy y Navaho a las cuatro semanas de cultivo *in vitro*.

Cultivares de <i>Rubus</i> sp.	Regul. crecimiento		Respuesta morfológica		
	ANA (mg/L)	AIB (mg/L)	Long. de raíces (mm) ¹	Núm. de raíces ¹	Sobreviv. explante (%)
Castilla	1	2	102 ± 46 a	2,5 ± 0,9 a	87,5
Castilla	—	1	97 ± 39 a	2,4 ± 1,8 a	96,7
Tupy	1	2	81 ± 68 a	2,7 ± 0,8 a	100
Tupy	—	1	58 ± 51 b	2,7 ± 1,0 a	83,3
Navaho	1	2	65 ± 54	1,7 ± 0,9	80,6
Navaho	—	1	—	—	—

¹ Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos para $p \leq 0,05$ de acuerdo a la prueba t.

En la Tabla 3 se muestra la respuesta del enraizamiento en los cultivares de *Rubus* sp a las cuatro semanas de cultivo empleando las auxinas ANA y AIB (Figura 3e y 3f). La longitud de raíces (102 y 97 mm)

y número de raíces (2,5 y 2,4) en el cultivar Castilla no mostraron diferencias significativas. El cultivar Tupy registró diferencias significativas en la longitud de raíces (81 mm), mostrando respuesta cuando se empleó ambas auxinas, en tanto, el número de raíces (2,7) no mostraron diferencias significativas. El cultivar Navaho, registró respuesta de inducción de raíces cuando se empleó ambas auxinas, registrando 65 mm y 1,7 de longitud y número de raíces, respectivamente.

Discusión

En su estado natural el género *Rubus* forma brotes caulinares subterráneos, iniciando la activación de una o más yemas latentes (Monasterio Huelin, 1995). Similar proceso ha sido observado *in vitro* en el presente estudio, donde los segmentos basales caulinares sometidos a oscuridad, probablemente permitió la activación de yemas latentes, reflejado en la regeneración de brotes adventicios, lo cual probablemente pueda ser explicado que el tratamiento en oscuridad tiene un efecto positivo en la producción de auxinas que permite la inducción y alargamiento del brote etiolado (Yang *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). Por otra parte, Muktadir *et al.* (2016) evaluaron la eficiencia de la regeneración de hipocótilos de plántulas de *Solanum melongena*, donde los periodos de oscuridad mejoran la regeneración de brotes adventicios, Zhang *et al.* (2016) reportaron que los hipocótilos y meristemos apicales de *Ricinus communis* requirieron tratamiento de oscuridad para promover un mayor número de brotes adventicios, Wang *et al.* (2019), empleando thidiazuron y 14 días de cultivo bajo oscuridad en explantes foliares de *Fragaria vesca* obtuvieron alto porcentaje y regeneración de brotes por explante. Makenzi *et al.* (2018), colocando esquejes de *Ipomoea batata* en oscuridad, demostraron que el número de yemas adventicias fueron mayores en aquellas colocadas bajo luz. Igualmente, Zhao *et al.* (2013) al someter explantes de *Rhodiola crenulata* a un pretratamiento de oscuridad, obtuvieron mayor números de brotes comparado a un control sin tratamiento de oscuridad.

En tanto, en *Lachenalia* sp. la regeneración del número de brotes y yemas empleando oscuridad está por debajo de las condiciones del espectro de luz blanca/azul y por encima del espectro de luz roja (Bach *et al.*, 2018). Por otra parte, en yemas de *Capsicum* el tratamiento de oscuridad por siete días no tiene efecto en la organogénesis (Gammoudi *et al.*, 2018).

El género *Rubus* ha sido propagado exitosamente por cultivo de tejidos, es así que, Cancino-Escalante *et al.* (2015) en el cv. Castilla registraron 21,6 mm de longitud de brotes y 1,8 brotes por explante empleando reguladores de crecimiento 2,5 mg/L de BAP más 0,03 mg/L de AG₃ a las cuatro semanas de establecidos *in vitro*, Ayub *et al.* (2019) reportaron longitud de brotes de 25 mm en el cv. Tupy a los 56 días en biorreactor de inmersión temporal. En el presente estudio se registró similares respuestas morfológicas en el cv. Castilla y Tupy sin el uso de reguladores de crecimiento y en menor tiempo. Sin embargo, existen reportes de regeneración de brotes adventicios en otras especies donde se emplea mayor periodo de tiempo, como los reportados en brotes de la selección IAPAR8 que requiere 30 días (Oliveira-Cauduro *et al.*, 2016); y brotes etiolados de *Anthurium*

maricense se obtienen en 60 días (Serafim *et al.*, 2018).

Taiz y Zeiger (2013) indican que las plántulas desarrolladas en oscuridad exhiben un crecimiento etiolado, caracterizado por el alargamiento de los hipocótilos y represión de genes regulados por la luz (aspectos escotomorfogénicos), similares eventos pudieron observarse en los brotes etiolados de los cultivares de *Rubus* sp., donde los entrenudos experimentaron alargamiento y no acumularon clorofila en la oscuridad (Figura 3b). Por otro lado, Taiz y Zeiger (2013), relatan que los pro-plastidios de las plantas etioladas no sintetizan clorofila, y una serie de enzimas y proteínas estructurales necesarias de la maquinaria fotosintética; estos pro-plastidios pueden también desarrollar a cloroplastos, cuando las plántulas etioladas son iluminadas, evento similar a lo observado cuando los brotes etiolados de *Rubus* sp. fueron sometidos a exposición de luz por siete días (Figura 3c).

En la presente investigación, el medio de enraizamiento permitió inducir raíces en los segmentos nodales a la cuarta semana de cultivo *in vitro*, y estuvieron aptos para su posterior fase de aclimatación. En tanto, Millones (2018), empleando 1 mg/L de AIB en la accesión silvestre de *Rubus* sp. (004-Rsp-UNTRM) registraron inducción de raíces a la novena semana de cultivo, similares respuestas de inducción de raíces fueron registrados en *Rubus idaeus*, *R. futicosus* empleando 1 mg/L de AIB, cuyas raíces fueron observadas después de seis semanas de incubación (Hunková *et al.*, 2016). Asimismo, Lebedev *et al.* (2019) registraron inducción de raíces a la sexta semana de cultivo en *R. idaeus* cuando emplearon 0,2 y 0,1 mg/L de AIB.

Conclusiones

Los segmentos basales caulinares de *Rubus* sp. cultivares Castilla, Tupy y Navaho, sometidos a periodos de 11 o 6 días en oscuridad, regeneran brotes adventicios etiolados sin el empleo de reguladores de crecimiento, facilitando la propagación *in vitro* de estos cultivares.

La combinación de AIB 2 mg/L más ANA 1 mg/L en el medio de enraizamiento, fueron adecuados en la inducción de raíces adventicias en segmentos nodales de los cultivares de *Rubus* sp.

La regeneración de brotes adventicios etiolados en los tres cultivares de *Rubus* sp. se obtiene en seis semanas aproximadamente, es decir una semana en el proceso de etiolación, una semana bajo fotoperiodo de los brotes etiolados y cuatro semanas de inducción de raíces adventicias bajo iluminación.

Referencias

- Alice, L. A. y Campbell, C. S. (1999). Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *American Journal of Botany*, 86(1), 81–97. <https://doi.org/10.2307/2656957>.
- Ayub, R. A., Dos Santos, J. N., Zanlorensi, L. A., Da Silva, D. M., De Carvalho, T. C. y Grimaldi, F. (2019). Sucrose concentration and volume of liquid medium on the *in vitro* growth and development of blackberry cv. Tupy in temporary immersion systems. *Ciencia e Agrotecnologia*, 43. <https://doi.org/10.1590/1413-7054201943007219>.

- Bach, A., Kapczyńska, A., Dziurka, K. y Dziurka, M. (2018). The importance of applied light quality on the process of shoot organogenesis and production of phenolics and carbohydrates in *Lachenalia* sp. cultures in vitro. *South African Journal of Botany*, 114, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.10.015>.
- Bueno, P. M. C., Biasi, L. A. y Tofaneli, M. B. D. (2018). Micropropagation protocol for the wild Brazilian greenberry (*Rubus erythroclados*). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 12(2), 405–415. <https://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i2.7226>.
- Cancino-Escalante, G. O., Quevedo García, E., Villamizar, C. E. y Díaz Carvajal, 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. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54262>.
- Clark, J. R. y Finn, C. E. (2014). Blackberry cult ivation in the world. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(1), 46–57. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-445/13>.
- Da Silva, N. D., Dutra, L. F., Bianchi, V. J., Sommer, L. R., Vargas, D. P. y Peters, J. A. (2016). Conservação in vitro de amoreira-preta: Crescimento lento. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 12(1), 7–12. <http://177.105.2.193/ojs/index.php/PlantCellCultureMicropropagation/article/view/82/36>.
- Gajdošová, A., Vujović, T., Súkeníková, M. y Libiaková, G. (2015). Improvement of adventitious organogenesis for regeneration of transgenic plants in blackberry. *Genetika*, 47(2), 599–608. <https://doi.org/10.2298/GENSR1502599G>.
- Gammoudi, N., Pedro, T. S., Ferchichi, A. y Gisbert, C. (2018). Improvement of regeneration in pepper: a recalcitrant species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 54(2), 145–153. <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9838-1>.
- Hunková, J., Libiaková, G., Fejér, J., Vujovic, T. y Gajdosová, A. (2018). Testing of different iron sources and concentrations on shoot multiplication of blackberry (*Rubus fruticosus* L.). *Genetika*, 50(1), 351–356. <https://doi.org/10.2298/GENSR1801351H>.
- Hunková, J., Libiaková, G. y Gajdošová, A. (2016). Shoot proliferation ability of selected cultivars of *Rubus* spp. as influenced by genotype and cytokinin concentration. *Journal of Central European Agriculture*, 17(2), 379–390. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/17.2.1718>.
- Lebedev, V., Arkaev, M., Dremova, M., Pozdniakov, I. y Shestibratov, K. (2019). Effects of growth regulators and gelling agents on ex vitro rooting of Raspberry. *Plants*, 8(1), 6–15. <https://doi.org/10.3390/plants8010003>.
- Makenzi, N. G., Mbinda, W. M., Okoth, R. O. y Ngugi, M. P. (2018). In Vitro Plant Regeneration of Sweetpotato Through Direct Shoot Organogenesis. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*, 06(01). <https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000207>.
- Millones, C. E. (2018). Establecimiento y ensayos preliminares de propagación in vitro de zarzamora silvestre (*Rubus* sp.) del Centro Poblado San Salvador, región Amazonas. *Revista de Investigación Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*, 2(2), 31–38. <http://dx.doi.org/10.25127/ucni.v3i2.316>.
- Monasterio Huelin, E. (1995). Biología de reproducción en *Rubus* L. (Rosaceae). Propagación vegetativa. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 52(2), 145–149. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1419193>.
- Muktadir, M. A., Habib, M. A., Khaleque Mian, M. A. y Yousuf Akhond, M. A. (2016). Regeneration efficiency based on genotype, culture condition and growth regulators of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Agriculture and Natural Resources*, 50(1), 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2014.10.001>.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Oliveira-Cauduro, Y. de, Lopes, V. R., Bona, C. M. De, Alcantara, G. B. de, y Biasi, L. A. (2016). Micropropagação de abacaxizeiro com enraizamento in vitro e ex vitro. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 12(2), 53–60. <https://doi.org/10.15446/acag.v66n1.54182>.
- Pérez-Martínez, B. A. y Castañeda-Garzón, S. L. (2016). In vitro propagation of *Rubus macrocarpus* Benth. and *Rubus bogotensis* Kunth, as an ex situ conservation strategy. *Acta Agronómica*, 66(1), 102–108. <https://doi.org/10.15446/acag.v66n1.54182>.
- Robres-Torres, E., López-Medina, J. y Rocha-Granados, M. C. (2015). Adventitious shoot elongation of raspberry (*Rubus idaeus* L.) is influenced by brassinosteroids. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(5), 991–999. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v6n5/v6n5a7.pdf>.
- Serafim, C. M., Campos, A. S., Dos Santos Melo, P. B., Ribeiro de Castro, A. C. y Portugal Pinto de Carvalho, A. C. (2018). Types and concentrations of cytokinins in the micropropagation of *Anthurium maricense*. *Revista Agro@Mambiente On-Line*, 12(2), 117–123. <https://doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v12i2.4671>.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2013). *Fisiología Vegetal* (Quinta). Artmet.
- Wang, H., Yang, Y., Li, M., Liu, J. y Jin, W. (2019). Reinvigoration of diploid strawberry (*Fragaria vesca*) during adventitious shoot regeneration. *Scientific Reports*, 9(1), 13007. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49391-8>.
- Yang, H., Klopotek, Y., Hajirezaei, M. R., Zerche, S., Franken, P. y Druege, U. (2019). Role of auxin homeostasis and response in nitrogen limitation and dark stimulation of adventitious root formation in petunia cuttings. *Annals of Botany*, 124(6), 1053–1066. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz095>.
- Zhang, J. X., Wang, X. Y., Feng, Z. Z., Geng, X. J., Mu, S. M., Huo, H. Y., Tong, H., Li, M. Z., Li, Y., Chi, Y. y Chen, Y. S. (2016). In vitro establishment of a highly effective method of castor bean (*Ricinus communis* L.) regeneration using shoot explants. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(6), 1417–1422. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61286-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61286-2).
- Zhao, Y., Stiles, A. R., Saxena, P. K. y Liu, C. Z. (2013). Dark preincubation improves shoot organogenesis from *Rhodiola crenulata* leaf explants. *Biologia Plantarum*, 57(1), 189–192. <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0261-5>.