

La elongación de brotes adventicios de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) es influenciada por brasinosteroides*

Adventitious shoot elongation of raspberry (*Rubus idaeus* L.) is influenced by brassinosteroids

Emmanuel Robres-Torres¹, José López-Medina¹ y Ma. del Carmen Rocha-Granados^{1§}

¹Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Av. Lázaro Cárdenas Esq. Berlín S/N. Uruapan, Michoacán. C. P. 60190. Tel: 014525236474. (chelin_12@hotmail.com; joselopezmedina@gmail.com). [§]Autora para correspondencia: crochagra@hotmail.com.

Resumen

La técnica de cultivo *in vitro* fue utilizada para estudiar el efecto de la combinación de benciladenina (BA) y brasinolido (BL), dos reguladores de crecimiento vegetal, en la formación y elongación de brotes adventicios de frambuesa (*Rubus idaeus* L.). También se evaluó el enraizamiento de los brotes regenerados tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. Tres selecciones de frambuesa, UMC-702, UMC-706 y UMC-708, generadas de un programa de mejoramiento genético en la Facultad de Agrobiología, fueron seleccionadas para llevar a cabo esta investigación. En la fase de multiplicación, el medio MS fue suplementado con diferentes combinaciones de benciladenina (0 y 1.5 mg L⁻¹) y brasinolido (0, 0.00001 y 0.00002 µM). La formación de brotes adventicios no fue dependiente de la combinación de los reguladores; sin embargo, la elongación de los mismos fue significativamente influenciada por el genotipo y el uso de brasinolido (BL); los mejores resultados se obtuvieron con la selección UMC-706 expuesta a 0.00002 µM de BL. El enraizamiento de los brotes adventicios fue mejor en condiciones *ex vitro* que *in vitro*, con mayor formación y elongación tanto de raíz como de los brotes; ello permitió una mejor aclimatación y adaptación de las plantas, lo que significa un ahorro tanto en tiempo como en costos de labor para la micropropagación de frambuesa. Así, este es el primer reporte del uso de brasinosteroides en frambuesa.

Abstract

In vitro culture techniques have been used to study the effect of the combination of benzyladenine (BA) and brassinolide (BL), two plant growth regulators, in the formation and adventitious shoot elongation of raspberry (*Rubus idaeus* L.). Rooting of regenerated shoots both *in vitro* and *ex vitro* conditions were evaluated. Three selections of raspberry, UMC-702 UMC-706 and UMC-708, generated from a breeding program at the Faculty of Agrobiology, were selected to conduct this research. In the multiplication phase, the MS medium was supplemented with different combinations of benzyladenine (0 and 1.5 mg L⁻¹) and brassinolide (0, 0.00001 and 0.00002 µM). Adventitious shoot formation was not dependent on the combination of regulators; however, the elongation of it was significantly influenced by genotype and use of brassinolide (BL); the best results were obtained with UMC-706 exposed to 0.00002 µM of BL. Rooting of adventitious shoots were better in *ex vitro* than *in vitro* conditions, with higher formation and elongation both root and shoots; allowing a better acclimatization and adaptation of plants, which means savings in time and labor for micro propagation of raspberry. So, this is the first report on the use of brassinosteroids in raspberry.

Keywords: *Rubus*, adventitious shoots, brassinolide, shoot elongation.

* Recibido: diciembre de 2014
Aceptado: abril de 2015

Palabras claves: *Rubus*, brasinólido, brotes adventicios, elongación de brotes.

Introducción

La propagación de frambuesa se realiza tradicionalmente de forma vegetativa, ya sea por separación de coronas o por brotes etiolados; sin embargo, en vista de la demanda masiva de material sano y vigoroso, se ha generado un gran interés por el uso de técnicas biotecnológicas como la de cultivo de tejidos vegetales. A este respecto, se han probado técnicas como la organogénesis directa e indirecta utilizando hojas de diferentes variedades comerciales (Isac, 2009) y la criopreservación de brotes apicales (Wang *et al.*, 2005; Gupta y Reed, 2006). Algunos sistemas para la micropropagación de frambuesa han utilizado el medio de cultivo MS (Muashige y Skoog, 1962) semisólido y líquido en inmersión temporal complementado con bencil amino purina (BAP), ácido giberélico (GA_3) y ácido ascórbico (Jones y Flores, 2007); también se reporta el uso de N^6 -benciladenina, tiazuron y zeatina (Reed, 1991; Popescue Isac, 1999; González *et al.*, 2000; Vujović *et al.*, 2009).

Además de los cinco grupos establecidos de fitohormonas, hay otras clases de compuestos de los cuales se sabe que regulan el crecimiento y desarrollo de las plantas; entre ellos se encuentran los brassinoesteroides (BRs), hormonas de tipo esteroidal (Mandava, 1988; Creelman y Mullet, 1997). Las primeras investigaciones sobre BRs se iniciaron a partir del aislamiento de la brassinólido (BL), cuando se observó que algunos extractos orgánicos presentes en el polen de *Brassica napus* promovían la elongación y división celular en los tallos de las plantas (Mitchell *et al.*, 1970; Grove *et al.*, 1979). El hecho de que cierto componente activador de estos extractos resultó ser un esteroide impulsó investigaciones internacionales sobre la química y fisiología de estos potentes reguladores del crecimiento (Rao *et al.*, 2002).

El crecimiento inducido por BRs se debe principalmente a la división y elongación celular; así, la 24-epibrasinólido aumenta la división de células parenquimatosas de *Helianthus tuberosus* (Clouse y Zurek, 1991), mientras que el tratamiento de protoplastos de repollo dio como resultado la activación de la división celular (Choi *et al.*, 1997). Se ha observado que la adición de la brassinólido, o sus homólogos 24-epi-brasinólido y 28-homobrasinólido, así como los efectos sinérgicos de éstos con auxinas y giberelinas, tienen

Introduction

Raspberry propagation is traditionally made vegetatively, either via separation of crowns or etiolated shoots; however, due to massive demand for healthy and vigorous material, it has been generated great interest in the use of biotechnological techniques such as plant tissue culture. In this regard, techniques like direct and indirect organogenesis have been used, using leaves from different commercial varieties (Isac, 2009) and cryopreservation of apical shoots (Wang *et al.*, 2005; Gupta and Reed, 2006). Some systems for raspberry micro propagation have used MS medium (Muashige and Skoog, 1962) semisolid and liquid in temporary immersion supplemented with benzyl amino purine (BAP), gibberellic acid (GA_3) and ascorbic acid (Jones and Flores, 2007); the use of N^6 -benzyladenine, thiazuron and zeatin (Reed, 1991; Popescue Isac, 1999; González *et al.*, 2000; Vujović *et al.*, 2009) has also been reported.

Besides the five groups of phytohormones, there are other classes of compounds which are known to regulate growth and development of plants; among them are brassinosteroids (BRs), steroid hormones type (Mandava, 1988; Creelman and Mullet, 1997). The first researches on BRs, initiated from the isolation of brassinólido (BL), when it was observed that some organic extracts in the pollen of *Brassica napus* promoted elongation and cell division in plant stems (Mitchell *et al.*, 1970; Grove *et al.*, 1979). The fact that some activator component of these extracts resulted a steroid, motivating international research on the chemistry and physiology of these potent growth regulators (Rao *et al.*, 2002).

The growth induced by BRs is mainly due to division and cell elongation; thus, the 24-epibrasinólido increases the division of parenchymal cells of *Helianthus tuberosus* (Clouse and Zurek, 1991), while cabbage protoplasts treatment resulted in the activation of cell division (Choi *et al.*, 1997). It has been observed that the addition of brassinólido, or its homologues 24-epi-brasinólido and 28-homobrasinólido, thus synergistic effects of these with auxins and gibberellins, have a positive response on proliferation of *in vitro* callus of *Spartina patens* (Lu *et al.*, 2003), shoot elongation of *Capsicum annuum* (Duchenne-Franck *et al.*, 1998) and in proliferation and shoot elongation of *Musa* spp. (Hassan-Nassar, 2004) and the proliferation of somatic embryos in conifers and rice (Pullman *et al.*, 2003).

una respuesta positiva sobre la proliferación *in vitro* de callos de *Spartina patens* (Lu *et al.*, 2003), la elongación de tallos de *Capsicum annuum* (Franck-Duchenne *et al.*, 1998), así como en la proliferación y elongación de brotes de *Musa* spp. (Hassan-Nassar, 2004) y la proliferación de embriones somáticos en coníferas y arroz (Pullman *et al.*, 2003).

Los BRs son componentes obligatorios de las plantas en tejidos de crecimiento y la respuesta a estos puede ser especialmente importante para que las plantas completen con éxito su ciclo de vida (Haubrick, 2006); interactúan con las auxinas para promover el desarrollo de raíces (Bao *et al.*, 2004). Dado que los BRs son un nuevo tipo de reguladores de crecimiento con múltiples actividades sobre las plantas, y que han sido poco utilizados en el cultivo de tejidos vegetales, el objetivo principal de esta investigación fue determinar el efecto del brasinolido, el brasinosteroide más activo, sobre la formación y elongación de brotes adventicios cultivados *in vitro* de tres selecciones avanzadas de frambuesa generadas mediante mejoramiento convencional.

Materiales y métodos

Material vegetativo

En la presente investigación se utilizaron yemas axilares de tres selecciones avanzadas de frambuesa (*Rubus idaeus* L.). Las plantas se encontraban en el Rancho de la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, localizado en la comunidad de Santa Rosa, Municipio de Uruapan, Michoacán. Al momento de la colecta el material vegetativo fue asperjado con Manzate (1 g L⁻¹), colocado sobre papel de estraza y puesto dentro de un embase de unicél térmico. Los materiales seleccionados presentaban las siguientes características: UMC-702: plantas caracterizadas por poseer tallos sin espinas con fruto de color rojo; UMC-706: plantas con pubescencia en el tallo y frutos de color amarillo y UMC-708: plantas con tallo pubescentes y frutos de color naranja.

Establecimiento *in vitro*

Se eligieron yemas apicales y laterales de las tres selecciones de frambuesa mencionados, de las cuales se cortaron 90 brotes de tamaño uniforme con tijeras de podar, entre los 9 y 12 cm de longitud. En el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Agrobiología, los brotes fueron lavados

BRs are mandatory components of plants in tissue growth and the response to these can be especially important for plants to successfully complete their life cycle (Haubrick, 2006); interact with auxin to promote root development (Bao *et al.*, 2004). Since BRs are a new type of growth regulators with multiple activities on plants, and have been rarely used in plant tissue culture, the main objective of this research was to determine the effect of brassinolide, the most active brasinosteroide, on the formation and elongation of adventitious shoots grown *in vitro* of three advanced selections of raspberry generated by conventional breeding.

Materials and methods

Vegetative material

In the present research axillary buds from three advanced selections of raspberry (*Rubus idaeus* L.) were used. The plants were in the Ranch from the Faculty of Agrobiology "Presidente Juárez" of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, located in the community of Santa Rosa, Municipality of Uruapan, Michoacan. At the time of collection, the vegetative material was sprinkled with Manzate (1 g L⁻¹), placed on brown paper and placed in a styrofoam bottle. Selected materials had the following characteristics: UMC-702: characterized by having stems without spines with red fruit; UMC-706: pubescence on the stem and yellow fruits and UMC-708: pubescent stem and orange fruits.

In vitro establishment

Apical and lateral buds of the three selections of raspberry were selected, of which 90 shoots of uniform size were cut with pruning shears between 9 and 12 cm in length. In the laboratory of Plant Physiology from the Faculty of Agrobiology, the shoots were washed with soap powder, and sectioned 1.5 to 2 cm in length; then treated with Manzate 200 (Dupont) 1 g L⁻¹ of water for 30 min stirring. In laminar flow hood, the explants were placed in a solution of sodium hypochlorite at 15% (v/v) for 25 min, followed by three rinses with sterile distilled water. For *in vitro* establishment each explant was placed in a test tube (20 mL) containing 10 mL of MS media supplemented with Anderson vitamins (Anderson, 1976) and 1 mg L⁻¹ benziladenine (BA). Once planted the explants, these were placed in a growth room at temperature of 24 ± 1 °C and a photoperiod of 16 h light and 8 h dark.

con jabón de polvo, y seccionados de 1.5 a 2 cm de longitud para posteriormente ser tratados con Manzate 200 (Dupont) 1 g L^{-1} de agua por 30 min en movimiento. En campana de flujo laminar, los explantes fueron colocados en una solución de hipoclorito de sodio al 15% (v/v) durante 25 min., seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril. Para su establecimiento *in vitro* cada explante fue colocado en un tubo de ensaye (20 mL) que contenía 10 mL del medio MS suplementado con vitaminas de Anderson (Anderson, 1976) y 1 mg L^{-1} de benciladenine (BA). Una vez sembrados los explantes, éstos se colocaron en un cuarto de crecimiento a temperatura de $24 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ y un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

Efecto del brasinolide

Para determinar el efecto de los brasinosteroides sobre el formación y elongación de yemas laterales de frambuesa, 5 yemas de cada una de las tres selecciones fueron colocadas en medio MS suplementado solamente con (0.00001 y $0.00002 \text{ } \mu\text{M}$) brasinolide 90% (Sunnton Chemical Company, USA), o mezclado éste con 1.5 mg L^{-1} de benciladenina; se incluyó un tratamiento solamente con BA y un testigo sin fitoreguladores. Las variables evaluadas en esta fase fueron: número de brotes por explante y longitud de brotes.

Para determinar las concentraciones y combinaciones de los reguladores utilizados en este trabajo nos basamos en el hecho de que la mayoría de los reportes mencionan que la mejor dosis de BA es de 1 a 2 mg L^{-1} , por lo cual se eligió una dosis intermedia de 1.5 mg L^{-1} . Para el caso de BL 90%, solo se seleccionaron dosis bajas (0.0001 y $0.00002 \text{ } \mu\text{M}$) debido a que se observó, en experimentos anteriores, que a mayores concentraciones de este fitoregulator las plántulas presentaron una mayor elongación y vetrificación, lo que dificultaba su adaptación y subsecuente sobrevivencia.

Enraizamiento *in vitro* y *ex vitro*

Para el enraizamiento *in vitro* se utilizó el método reportado por Avitia-García (1984), donde se utilizaron sales MS al 50% de su concentración y la adición de 15 a 20 g L^{-1} de sacarosa al medio de cultivo, sin la utilización de reguladores de crecimiento. Para el enraizamiento *ex vitro* se utilizó la técnica reportada por Acurero-Matus (2007), con adición del enraizador comercial "Radix 1 500" (ácido indol-3-butírico, 1 500 ppm). De cada selección de frambuesa se extrajeron 90 explantes y a éstos se les retiró el medio de cultivo, se impregnaron del enraizador y se colocaron en charolas con

Effect of brassinolide

To determine the effect of brassinosteroids on the formation and elongation of lateral buds of raspberry, 5 buds from each of the three selections were placed in MS medium supplemented only with (0.00001 and $0.00002 \text{ } \mu\text{M}$) 90% brassinolide (Sunnton Chemical Company, USA), or mixing it with 1.5 mg L^{-1} benzyladenine; a treatment just with BA and control without growth regulators were included. The assessed variables in this phase were: number of shoots per explant and shoot length.

To determine the concentrations and combinations of regulators used in this work we rely on the fact that most of the reports mention that the best dose of BA is $1\text{-}2 \text{ mg L}^{-1}$, reason why an intermediate dose of 1.5 mg L^{-1} was chosen. In the case of 90% BL, only low doses (0.0001 and $0.00002 \text{ } \mu\text{M}$) were selected because it was observed in earlier experiments, that at higher concentrations of this plant regulator, seedlings showed a higher elongation and vitrification, making difficult its adaptation and subsequent survival.

In vitro and *ex vitro* rooting

For *in vitro* rooting the method used was that reported by Avitia-García (1984), where MS salts were used at 50% of its concentration and the addition of 15 to 20 g L^{-1} of sucrose to the culture medium, without using growth regulators; for *ex vitro* rooting the technique used was that reported by Acurero-Matus (2007), with addition of commercial rooting "Radix 1500" (indole-3-butyric acid, 1500 ppm). From each raspberry selection, 90 explants were removed, then the culture medium was withdrawn from them, impregnated with rooting and placed in trays with Canadian peat (peat-moss) previously disinfected in an autoclave at a temperature of $121 \text{ }^\circ\text{C}$ for 15 min. For this case the assessed variables were number of roots and length of plants.

Experimental design

To evaluate the number and length of shoots a completely randomized design with six treatments replicated five times, each experimental unit was represented by five plants. In the rooting stage both *in vitro* and *ex vitro* only two treatments were used, each represented by 30 experimental units and replicated three times. The analysis of variance and comparison test (Tukey, $p \leq 0.05$) of information was performed using the statistical package Java Memory Profiler (JMP, version 7, 2008).

turba canadiense (“peat-moss”) previamente desinfectada en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 min. Para este caso las variables evaluadas fueron número raíces y longitud de plantas.

Diseño experimental

Para evaluar el número y longitud de brotes se utilizó un diseño experimental completamente al azar con seis tratamientos repetidos cinco veces, cada unidad experimental estuvo representada por cinco plantas. En la etapa de enraizamiento tanto *ex vitro* e *in vitro* se utilizaron solamente dos tratamientos, cada uno representado por 30 unidades experimentales y repetido tres veces. El análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey, $p \leq 0.05$) de la información se realizó con ayuda del paquete estadístico Java Memory Profiler (JMP, versión 7, 2008).

Resultados y discusión

Formación de brotes

En relación a la formación de brotes, se observó que la adición de brasinolide (BL) en combinación con benciladenina (BA) resultó más efectiva que con solo la adición de BL (Figura 1). Aunque el análisis de varianza no mostró diferencia significativa entre las selecciones, sí se encontró una gran diferencia entre tratamientos, donde los valores más altos correspondieron a aquellos que solo contenían BA o la combinación de ésta con cualquiera de las dosis de BL; y aunque menos eficientes, los tratamientos que solo contenían BL mostraron mayor número de brotes que el testigo (Figura 2).

La cantidad de brotes de frambuesa producidos *in vitro* depende en gran medida de la concentración de las citocininas, específicamente la benciladenina, y del cultivar propagado (Avitia y Rodríguez, 1984; McNicol and Graham, 1990). Se ha observado que varios cultivares de frambuesa responden a concentraciones que van desde 0.5 hasta 2 mg L⁻¹ de BA en combinación con AIB o ANA, o solo zeatina (Graham *et al.*, 1997; Palonem y Buszard, 1998; Debnath, 2004; Zawadzky Orlikowska, 2006; Wu *et al.*, 2009), o bien de 1 a 2 mg L⁻¹ de tidiazuron con 0.5-1 mg L⁻¹ de ácido 1*H*-indole-3-butanoico (AIB) (Swartz *et al.*, 1990; Cousineau y Donnelly, 1991).

Results and discussion

Shoot formation

Regarding shoot formation, it was observed that the addition of brassinolide (BL) in combination with benzyladenine (BA) was more effective than adding just BL (Figure 1). Although the analysis of variance showed no significant difference between selections, but a great difference was found between treatments, where the highest values corresponded to those that contained only BA or the combination of this with either dose of BL; and although less efficient, treatments that contained only BL showed higher number of shoots than control (Figure 2).

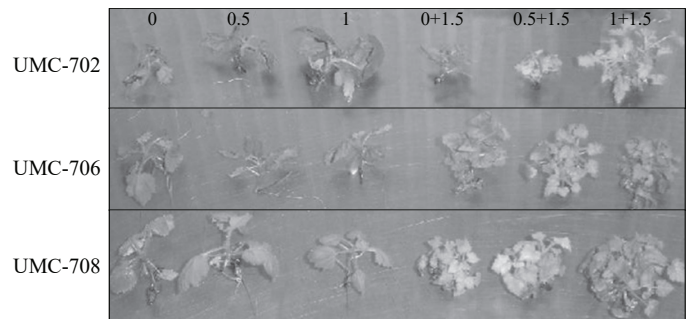


Figura 1. Efecto de brasinolide (0.00001 y 0.00002 μM) con (1.5 mg L⁻¹) y sin benciladenina sobre la proliferación de brotes adventicios de tres selecciones de frambuesa.

Figure 1. Effect of brassinolide (0.00001 and 0.00002 μM) with (1.5 mg L⁻¹) and without benzyladenine on the proliferation of adventitious shoots of three selections of raspberry.

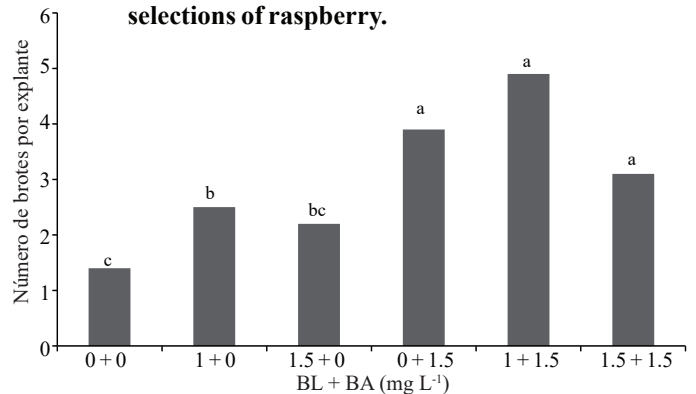


Figura 2. Efecto de la concentración de brasinolide (BL= 1 (0.00001 μM) y 1.5 (0.00002 μM) y benciladenina (BA= 1.5 mg L⁻¹) sobre la formación de brotes en selecciones avanzadas de frambuesa. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

Figure 2. Effect of the concentration of brassinolide (BL= 1 (0.00001 μM) and 1.5 (0.00002 μM) and benzyladenine (BA= 1.5 mg L⁻¹) on shoot formation in advanced selections of raspberry. Bars with the same letter are statistically equal (Tukey, 0.05).

En esas investigaciones se reportó un número máximo de 3.8 brotes por explante, lo cual difiere de lo obtenido en el presente trabajo, donde se obtuvieron hasta 4.8 brotes por explante; y aunque la adición de brasinolido no tuvo un efecto significativo en la proliferación de brotes, se observó que la mejor respuesta se obtuvo a una concentración de 1.5 mg L⁻¹ de BA sola o en combinación con cualquiera de la dosis de brasinolido (Figura 2).

En algunos trabajos se ha observado que el homobrasinolido, un análogo de brasinolido, en combinación con AIA o 2iP, tienen un pronunciado efecto en la estimulación de brotes de meristemas apicales de banana (Hassan-Nassar, 2004). En este mismo sentido, la adición de brasinolido al medio de cultivo, en concentraciones de 0.005 mg L⁻¹, contribuyeron en el crecimiento de los brotes regenerados de *Spartina petens* (Lu *et al.*, 2003).

En los procesos de regeneración y propagación *in vitro* de un gran número de plantas se han utilizado las citocininas combinadas con las auxinas como reguladores de crecimiento, para la obtención de brotes laterales o adventicios de un sin número de plantas tanto herbáceas como leñosas (Gaspar *et al.*, 1996), mientras que los brasinosteroides, que presentan una amplia distribución en el reino vegetal y muestran una inusual actividad promotora del crecimiento cuando son aplicados exógenamente, han sido poco utilizados en estos procesos, aun y cuando se ha demostrado su efecto sinérgico con auxinas y citocininas (Bao *et al.*, 2004).

Elongación de brotes

Respecto a la elongación de brotes generados en cada una de las selecciones, se encontró que la selección UMC-702 generó brotes de mayor longitud (1.2 cm), seguida por la selección UMC-708 (0.8 cm) y la UMC-706 (0.4 cm), con diferencias estadísticas significativas (Tukey, 0.05) solo entre esta última y UMC-702.

Experimentos realizados con brasinosteroides han demostrado que su aplicación en muy bajas concentraciones activan una serie de procesos fisiológicos en diferentes tipos de plantas (Rao *et al.*, 2002). Muchos de sus efectos son a nivel de elongación de hipocotilos, como en el caso de frijol (Gregory y Mandava, 1982), chicharo (Clouse y Zurek, 1991) y rábano (Takatsuto, 1994), lo cual concuerda con los resultados en la presente investigación. A pesar de que poco han sido los trabajos en los cuales se ha utilizado

The number of raspberry shoots produced *in vitro* depend largely on the concentration of cytokinins, specifically benzyladenine and on the propagated cultivar (Avitia and Rodriguez, 1984; McNicol and Graham, 1990). It has been observed that several cultivars of raspberry respond to concentrations ranging from 0.5 to 2 mg L⁻¹ of BA in combination with IBA or IAA, or only zeatin (Graham *et al.*, 1997; Palonem and Buszard, 1998; Debnath, 2004; Zawadzka Orlikowska, 2006; Wu *et al.*, 2009), or 1-2 mg L⁻¹ of thidiazuron with 0.5-1 mg L⁻¹ 1H-indole-3-butanoic acid (IBA) (Swartz *et al.*, 1990; Cousineau and Donnelly, 1991).

On those researches a maximum of 3.8 shoots per explant was reported, which differs from that obtained in the present work, where were obtained up to 4.8 shoots per explant; and although the addition of brassinolide had no significant effect on shoot proliferation, it was observed that the best response was obtained at a concentration of 1.5 mg L⁻¹ of BA alone or in combination with any of the doses of brassinolide (Figure 2).

In some studies it has been observed that the homobrasinolide, a brassinolide analog, in combination with IAA or 2iP, have a pronounced effect on the stimulation of shoots of apical meristems in banana (Hassan-Nassar, 2004). In this regard, the addition of brassinolide to the culture medium at concentrations of 0.005 mg L⁻¹, contributed to the growth of regenerated shoots of *Spartina petens* (Lu *et al.*, 2003).

In the regeneration process and *in vitro* propagation of a large number of plants, cytokinins and auxins have been used in combination with growth regulators, to obtain lateral or adventitious shoots of a countless number of plants both herbaceous and woody (Gaspar *et al.*, 1996), while brasinosteroids have a large distribution in the plant kingdom and show an unusual growth promoting activity when applied exogenously, have been rarely used in these processes, even when it has been proven its synergistic effect with auxins and cytokinins (Bao *et al.*, 2004).

Shoot elongation

Regarding to shoots elongation generated in each of the selections, was found that UMC-702 selection generated longer shoots (1.2 cm), followed by UMC-708 (0.8 cm) and UMC-706 (0.4 cm), with statistically significant differences (Tukey, 0.05) only between the latter and UMC-702.

a los BRs como reguladores de crecimiento en cultivo *in vitro*, su efecto mostrado en el presente trabajo fue similar a los observados sobre hipocotilos de chile pimienta, en donde la 24-epi-brassinolido, un análogo del brassinolido, estimuló el desarrollo de tallos cuando fue usada sola, mientras que su efecto fue inhibido al combinarse con zeatina o giberelinas (GA_3) (Franck-Duchenne *et al.*, 1998). En otros estudios realizados en banana con el homobrasinolido, otro análogo del BL, se encontró que cuando ésta era adicionada simultáneamente o secuencialmente con el 2iP al medio de cultivo, la inducción y elongación de brotes fue marcadamente mejorada, con un efecto aditivo de los dos reguladores (Hassan-Nassar, 2004).

Enraizamiento y crecimiento de brotes

En cuanto al número de raíces a partir de los brotes generados *in vitro*, hubo una mayor eficiencia en condiciones *ex vitro*, con el mayor número de raíces y longitud de brotes logrados en la selección UMC 706 (Cuadro 1; Figura 4).

Cuadro 1. Desarrollo de raíces y brotes vegetativos tanto *in vitro* como *ex vitro* en tres selecciones avanzadas de frambuesa.
Table 1. Root development and vegetative shoots both *in vitro* and *ex vitro* in three advanced selections of raspberry.

Selección	Número de raíces por explante		Longitud de brotes (cm)	
	<i>in vitro</i>	<i>ex vitro</i>	<i>in vitro</i>	<i>ex vitro</i>
UMC-702	4.20 a ^z	5.30 b	1.90 b	2.30 b
UMC-706	3.30 a	10.20 a	2.50 a	3.30 a
UMC-708	2.80 a	5.90 ab	2.40 a	2.50 b

^zValores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05)

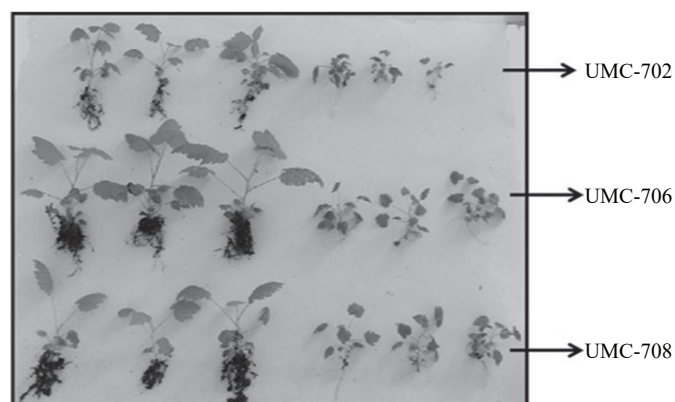


Figura 4. Elongación de brotes y formación de raíz de tres selecciones de frambuesa (UMC-702, UMC-706 y UMC-708) desarrolladas tanto *ex vitro* (izquierda) como *in vitro* (derecha).

Figure 4. Shoot elongation and root formation of three raspberry selections (UMC-702, UMC-706 and UMC-708) developed in *ex vitro* (left) and *in vitro* (right).

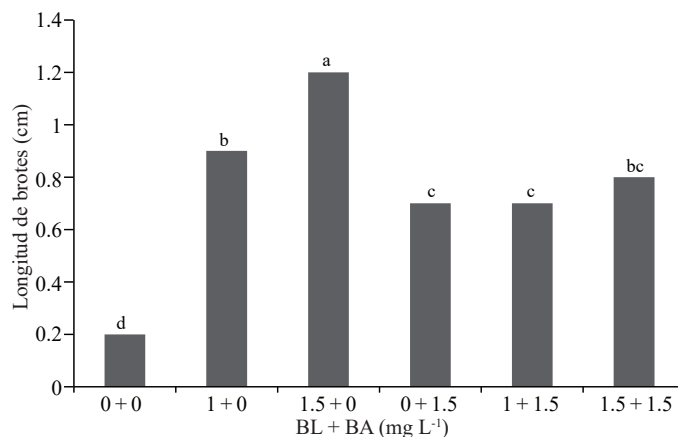


Figura 3. Efecto de la concentración de brasinolide (BL= 1 (0.00001 μ M) y 1.5 (0.00002 μ M) y benziladenina (BA) sobre la formación de brotes en selecciones avanzadas de frambuesa. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

Figure 3. Effect of the concentration of brassinolide (BL= 1 (0.00001 μ M) and 1.5 (0.00002 μ M) and benzyladenine (BA) on shoot formation in advanced selections of raspberry. Bars with the same letter are statistically equal (Tukey, 0.05).

Experiments conducted with brassinosteroid have demonstrated that its application in very low concentrations activate a series of physiological processes in different types of plants (Rao *et al.*, 2002). Many of their effects are at hypocotyls elongation, as in the case of beans (Gregory and Mandava, 1982), pea (Clouse and Zurek, 1991) and radish (Takatsuto, 1994), which is consistent with the results in the present research. Although a few have been works in which BRs has been used as growth regulators on *in vitro* culture, the effects show in this study were similar to those observed on hypocotyls of chile peppers, where 24-epi-brassinolide, a brassinolide analogous, stimulated the development of stems when it was used alone, whereas its effect was inhibited when combined with zeatin or gibberellin (GA_3) (Franck-Duchenne *et al.*, 1998). In other studies performed in banana with homobrasinolide, another BL analogous, it was found that, when added simultaneously or sequentially with the

El enraizamiento de los brotes es una parte importante de cualquier esquema de propagación *in vitro*. Usualmente es necesario que los explantes sean puestos en un medio especial para formar raíces, incrementando así el tiempo y costo en estos procesos. Una manera de reducir el costo en la micropropagación puede ser removiendo los explantes sin raíz de las condiciones *in vitro* y enraizarlos en un sustrato especial *ex vitro* (George *et al.*, 2008). En el presente trabajo fue evidente una mayor formación de raíces y elongación de brotes bajo condiciones *ex vitro* que *in vitro*.

La mayoría de las observaciones del enraizamiento *in vitro* de las frambuesas revelan que el medio MS, con la mitad de las sales minerales y suplementado con auxinas, es esencial para la potenciación de la rizogénesis (Isac, 2009). Sin embargo, nuestros resultados muestran que la mayor formación de raíces en las selecciones utilizadas se logró en condiciones *ex vitro*, mientras que en condiciones *in vitro* el enraizamiento fue menos eficiente, las plantas fueron más cortas, y con poca raíces que las cultivadas *ex vitro*.

Conclusiones

Los brasinoesteroides son un nuevo tipo de reguladores de crecimiento que presentaron un efecto marcado sobre la elongación de los brotes adventicios de frambuesa crecidas *in vitro*, pero no sobre la inducción y formación de los mismos, pues los análisis estadísticos demostraron que cuando se pasaron a un medio con benciladenina no hubo un aumento significativo en el número de brotes.

Así mismo, se observó que tanto la etapa de aclimatación como la de enraizamiento *ex vitro* son procesos que se pueden llevar a cabo al mismo tiempo, evitándose la fase de enraizamiento *in vitro* de las plántulas de frambuesa.

Literatura citada

- Acurero, M. A. M. 2007. Optimización de un protocolo de cultivo *in vitro* de *Aloe vera* L. (Zábila). Ciencia. 15(3):319-330.
- Anderson, J. O. 1976. Embryogenesis in wild carrot cells. *In vitro* 12:332.
- Avitia, G. E. y Rodríguez, A. J. 1984. El cultivo de frambuesa roja. Centro de fruticultura, Colegio de Posgraduados, Montecillo, Estado de México. 33 p.
- Bao, F.; Shen, J.; Brady, S. R.; Mudas, G. K.; Asami, T. and Yang, Z. 2004. Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in arabidopsis. *Plant Physiol.* 134(4):1624-1631.

2iP to the culture medium, the induction and elongation of shoots was highly improved, with an additive effect of the two regulators (Hassan-Nassar, 2004).

Rooting and shoot growth

As for the number of roots from shoots generated *in vitro*, there was a higher efficiency in *ex vitro* conditions, with the higher number of roots and shoot length achieved in selection UMC 706 (Table 1; Figure 4).

Rooting of shoots is an important part of any scheme of *in vitro* propagation. It is necessary to place the explants in a special medium to form roots, thus increasing the time and cost in these processes. One way to reduce the cost in micro propagation could be by removing the explants without roots from *in vitro* conditions and root them in a *ex vitro* special substrate (George *et al.*, 2008). In this paper was evident an increased root formation and shoot elongation under *ex vitro* than *in vitro* conditions.

Most observations of *in vitro* rooting from raspberries reveal that the MS medium with half the minerals and supplemented with auxin is essential for the strengthening of rooting (Isac, 2009). However, our results show that most root formation in the selections used were achieved in *ex vitro* conditions, while *in vitro* conditions, rooting was less efficient, the plants were shorter, and with few roots than those developed *ex vitro*.

Conclusions

Brassinosteroids are a new type of growth regulators that have a marked effect on elongation of adventitious shoots of raspberries grown *in vitro*, but not on the induction and formation of the same, as statistical analyzes showed, when switched to a benzyladenine medium there was no significant increase in the number of shoots.

Also, it was observed that both acclimatization and rooting stage on *ex vitro* are processes that can be performed at the same time, avoiding the rooting stage *in vitro in vitro* of raspberry seedlings.

End of the English version



- Choi, Y. H.; Fujioka, S.; Nomura, T.; Harada, A.; Yokota, T.; Takatsuto, S. and Sakurai, A. 1997. An alternative brassinolide biosynthetic pathway via late C-6 oxidacion. *Phytochemistry*. 44:609-613.
- Clouse, S. D. and Zurek, D. 1991. Molecular analysis of brassinolide action in plant growth and development. *In*: Cluter, H. G.; Adam, G. and Yokota, T. (Eds.). *Brassinosteroids: chemistry, bioactivity and applications* (acs symposium series). American Chemical Society. Washington, D. C. 122-140 p.
- Cousineau, C. J. and Donnelly, J. D. 1991. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of tissue culture and greenhouse-grown raspberry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 27:249-255.
- Creelman, R. A. and Mullet, J. E. 1997. Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: Nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *Plant and Cell*. 9:1211-1223.
- Debnath, S. C. 2004. Clonal propagation of dwarf raspberry (*Rubus pebescens* Raf.) through *in vitro* axillary shoot proliferation. *Plant Growth Regulation*. 43:179-186.
- Franck-Duchenne, M.; Wang, Y.; Ben, T. S. and Beachy, R. N. 1998. *In vitro* stem elongation of sweet pepper in media containing 24-epi-brassinolide. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 53:79-84.
- Gaspar, T.; Kevers, C.; Penel, C.; Greppin, H.; David, M. R.; Thorpe, T. A. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro cell and developmental biology* 32 (4):272-289.
- George, F. E.; Hall, A. M. and De Klerk, G.-J. 2008. Micropropagation: uses and methods. *In*: George, E. F. (Ed.). *Plant propagation by tissue culture*. 3th Edition, Springer, Dordrecht. 29-64 pp.
- González, M. V.; López, M.; Valdes, A. E. and Ordas, R. J. 2000. Micropropagation of three berry fruit species using segments from field-grown plants. *Ann. Appl. Biol.* 137(1):73-78.
- Graham, J.; Iasi, L. and Millian, S. 1997. Genotyp-specific regeneration from a number of *Rubus* cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 48:167-173.
- Gregory, L. E. and Mandava, N. B. 1982. The activity and interaction of brassinolide and gibberellic acid in mung bean epicotyls. *Plant Physiol.* 54:239-243.
- Grove, M. D.; Spencer, G. F.; Rohwedder, W. K.; Mandava, N. B. and Worley, J. F. 1979. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* 281:216-17.
- Gupta, S.; Reed, B. M. 2006. Cryopreservation of shoot tips of blackberry and raspberry by encapsulation-dehydration and vitrification. *Cryo Letters*. 27(1):29-42.
- Hassan-Nassar, A. 2004. Effect of homobrassinolide on *in vitro* growth of apical meristems and heat tolerance of babana shoots. *Int. J. Agric. Biol.* 6(5):771-775.
- Haubrick, L. L. 2006. Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles. *Plant Cell and Environment*. 29(3):446-447.
- Isac, V. 2009. Protocol for *in vitro* micropropagation of raspberry, and plant regeneration by organogénesis. *In*: Mezzetti, B.; Ružić, D. and Gajdosova, A. (Eds.). *A guide to some in vitro techniques. Small fruits. European research: from genomics to sustainable production, quality and health.* 14-23 pp.
- Jones, C. F. y Flores, M. D. 2007. Establecimiento *in vitro* y pruebas preliminares de micropropagación en medio semisólido y líquido de frambuesa (*Rubus idaeus* L.). *Tecnología en Marcha*. 20(3):46-54.
- Lu, Z.; Huang, M.; Ge, D.-P.; Yang, Y.-H.; Cai, X.-N.; Qin, P. and She, J.-M. 2003. Effect of brassinolide on callus growth and regeneration in *Spantina patens* (Poaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 73:87-89.
- Mandava, N. B. 1988. Plant growth-promoting brassinosteroids. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:23-52.
- McNicol, R. J. and Graham, J. 1990. *In vitro* regeneration of *Rubus* from leaf and stem segments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 21: 45-50.
- Mitchell, J. W.; Mandava, N. B.; Worley, J. F.; Plimmer, J. R. and Smith, M. V. 1970. A unique plant growth promoting steroid from *Brassica napus* pollen. *Nature* 225: 1065-1066.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*. 15:473-497.
- Palonen, P. and Buszard, D. 1998. *In vitro* screening for cold hardiness of raspberry cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 53:213-216.
- Popescu, A. N. and Isac, V. 1999. High frequency of shoot regeneration from leaf-derived callus in raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Acta Horticulturae*. 538:667-672.
- Pullman, G. S.; Zhang, Y. and Phan, B. H. 2003. Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. *Plant Cell Reports*. 22:96-104.
- Rao, S. S. R.; Vardhini, B. V.; Sujatha, E. and Anuradha, S. 2002. Brassinosteroids- A new class of phytohormones. *Current Science*. 82(10):1239-1243.
- Reed, M. B. 1991. The use of zeatin to initiation *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars. *HortScience*. 26(10):1320-1322.
- Swartz, J. H.; Bors, R.; Mohamed, F. and Naess, S. K. 1990. The effect of *in vitro* pretreatments on subsequent shoot organogenesis from excised *Rubus* and *Malus* leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 21:179-184.
- Takatsuto, S. 1994. Brassinosteroids: distribution in plants, bioassays and microanalysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 658:3-15.
- Vujović, T.; Ružić, Đ. and Cerović, R. 2009. Plant regeneration by organogénesis in blackberry. *In*: Mezzetti, B.; Ružić, D. and Gajdosova, A. (eds.). *A guide to some in vitro techniques. Small fruits. European research: from genomics to sustainable production, quality and health.* 30-33 pp.
- Wang, Q.; Laamanen, J.; Uosakainen, M. and Valkonen, J. P. T. 2005. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. *Plant Cell Reports*. 24:280-288.
- Wu, J.-H.; Miller, A. S. and Hall, H. K. 2009. Factors affecting the efficiency of micropropagation from lateral buds and shoot tips of *Rubus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99:17-25.
- Zawadzka, M. and Orlikowska, T. 2006. The influence of Fe EDDHA in red raspberry cultures during shoot multiplication and adventitious regeneration from leaf explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 85:145-149.