



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

“ZARAGOZA”

PROPAGACION IN VITRO DE VARIEDADES SELECTAS
DE FRAMBUESA Y ZARZAMORA (Rubus spp.)

TESIS

Que para obtener el Título de:

BIOLOGO

Presenta:

PATRICIA KOLEFF OSORIO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F. 1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	3
1. CLASIFICACION BOTANICA	3
2. DESCRIPCION BOTANICA	3
2.1. Características del género <u>Rubus</u>	3
2.2. Características de la frambuesa	4
2.3. Características de la zarzamora	4
3. DISTRIBUCION	6
4. ORIGEN	6
4.1. Antecedentes citotaxonómicos	6
4.2. Historia y centros de origen	8
4.2.1. Frambuesas (<u>Idaeobatus</u>)	8
4.2.2. Zorzamoras (<u>Eubatus</u>)	9
5. CULTIVO DE LA FRAMBUESA Y ZARZAMORA	10
5.1. Clima	10
5.2. Suelo	10
5.3. Cultivo	11
5.4. Cosecha y almacenamiento	11
6. USOS DE LA FRAMBUESA Y ZARZAMORA	12
7. METODOS DE PROPAGACION TRADICIONAL	14
8. CULTIVO <u>IN VITRO</u> DE <u>RUBUS</u>	14
MATERIALES Y METODOS	20
1. MATERIAL VEGETATIVO	20
2. COLECTA DEL MATERIAL VEGETATIVO	20
3. DESINFESTACION	21
4. MEDIOS DE CULTIVO	22
5. ESTABLECIMIENTO A CONDICIONES <u>IN VITRO</u>	26
6. INDUCCION A LA PROLIFERACION	27

7. CONDICIONES DE CULTIVO	27
8. ENRAIZAMIENTO	28
9. ADAPTACION DE LAS PLANTULAS OBTENIDAS <u>IN VITRO</u> A CONDICIONES AMBIENTALES	29
10. REGISTRO DE DATOS	32
11. ANALISIS ESTADISTICO	32
RESULTADOS Y DISCUSION	33
1. DESINFESTACION	33
2. ESTABLECIMIENTO A CONDICIONES <u>IN VITRO</u>	37
3. PROLIFERACION DE BROTES	47
3.1. Frambuesa	47
3.1.1. Número de brotes	47
3.1.2. Número de hojas	52
3.1.3. Longitud de los brotes	52
3.1.4. Peso	55
3.2. Zarzamora	60
3.2.1. Número de brotes	60
3.2.2. Número de hojas	64
3.2.3. Longitud de los brotes	64
3.2.4. Peso	67
3.3. Efecto de la intensidad luminosa	70
3.3.1. Frambuesa	70
3.3.2. Zarzamora	73
4. ENRAIZAMIENTO	77
4.1. Influencia de la longitud del brote	77
4.1.1. Frambuesa	79
4.1.1.1. Número de raíces	79
4.1.1.2. Longitud de las raíces	81
4.1.1.3. Peso	81
4.1.2. Zazamora	81
4.1.2.1. Número de raíces	81
4.1.2.2. Longitud de las raíces	84
4.1.2.3. Peso	84
4.2. Influencia del grosor de la base del brote ..	84
4.2.1. Frambuesa	85
4.2.1.1. Número de raíces	85
4.2.1.2. Longitud de las raíces	85
4.2.1.3. Peso	89
4.2.2. Zazamora	89
4.2.2.1. Número de raíces	89
4.2.2.2. Longitud de las raíces	91
4.2.2.3. Peso	91

5. ADAPTACION DE LAS PLANTULAS A CONDICIONES AMBIENTALES	91
CONCLUSIONES	93
ANEXO 1	96
APENDICE A	114
BIBLIOGRAFIA	115

RESUMEN

Los frutos de frambuesa y zarzamora poseen un alto potencial de utilidad en el campo de la nutrición y de la industria, ya que la producción de estas especies en México es muy promisoría debido a su cultivo sencillo, su alta productividad, su uso integral y a la época de fructificación temprana de estos cultivares en el país. Sin embargo, el rendimiento de estos cultivos puede verse fuertemente afectado por problemas fitosanitarios y de propagación a gran escala al emplear las técnicas tradicionales; por lo que en este trabajo se propagaron masivamente cuatro variedades de alta calidad de frambuesa y zarzamora, utilizando la técnica de cultivo de tejidos vegetales in vitro.

Se utilizaron como inóculos ápices vegetativos y yemas axilares de las variedades 'Amber' y 'Heritage' de frambuesa roja (Rubus idaeus) y las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem' de zarzamora (Rubus sp.).

Se determinó que el tratamiento de desinfección más adecuado para el cultivo in vitro de las variedades estudiadas es el hipoclorito de sodio al 1.2 % (solución comercial al 20 % v/v) durante 30 minutos. El establecimiento y desarrollo inicial de los ápices de brotes resultó favorable con 1.0 mg/l de Benciladenina (BA) y 0.1 mg/l de Acido indol butírico (IBA), siendo necesaria la adición de agentes antioxidantes (L-Cisteína) para evitar la oxidación y muerte del tejido.

El mejor medio de proliferación de brotes para las variedades de frambuesa fue el de Anderson, con la concentración hormonal de 0.8 mg/l de BA; la variedad 'Heritage' tuvo la mayor producción de brotes en este medio con consistencia sólida y en medios con consistencia líquida la variedad 'Amber'.

Para las dos variedades de zarzamora el mejor medio de proliferación fue el de las sales basales de Murashige y Skoog al 100 % de su concentración con consistencia sólida y la concentración hormonal de 0.8 mg/l de BA.

Los brotes obtenidos in vitro se enraizaron en agrolita bajo condiciones de alta humedad relativa. La longitud de los brotes tuvo efecto significativo en la inducción del sistema radical, así como en el número y la longitud de las raíces, independientemente del grosor de la base del brote; y los mejores resultados se obtuvieron al enraizar brotes mayores de 3.0 cm.

Las plántulas se adaptaron a condiciones ambientales en una mezcla de tierra negra y agrolita (3:1); cabe señalar que los brotes enraizados espontáneamente in vitro pudieron ser transferidos directamente a suelo, con éxito.

INTRODUCCION

México cuenta con un gran número de especies vegetales potencialmente útiles e importantes en el campo de la nutrición y de la industria, que no han sido aprovechadas adecuadamente. Dichas especies pueden contribuir a solucionar problemas que afronta actualmente el país, como son la necesidad de incrementar la producción de alimentos, buscar fuentes alimentarias alternativas que permitan diversificar nuestra dieta incorporándose de alguna forma a la alimentación humana o a la animal, disminuir la dependencia tecnológica sobre el manejo de recursos, explotar zonas que no se utilizan para la producción agrícola, etc. (56).

Entre estas especies potenciales se encuentran la frambuesa y la zarzamora (*Rubus* spp), las cuales tienen un alto valor nutritivo, comparable al de la fresa, y un contenido vitamínico equiparable al de la naranja o al del limón, pero sobrepasándolos a éstos en su valor calorífico (13, 114); además de las repercusiones significativas que adquieren comercialmente debido al uso que tienen en la industria para la fabricación de conservas, esencias, jarabes, tintes, etc. (13, 105, 114). Aunado a lo anterior, la frambuesa y la zarzamora presentan la ventaja de adaptarse a varios tipos de suelos y aun en terrenos tan dispares como las laderas de montañas y terrenos pedregosos (2, 83, 84), esto significa que terrenos no agrícolas, tan abundantes en nuestro país, pueden ser aprovechados cultivando estos frutales.

Tradicionalmente la frambuesa y la zarzamora se han propagado asexualmente (8, 21, 40, 69), mediante este método la propagación es lenta y provoca una reducción en la difusión de los cultivares, ya que se presenta la dificultad de propagarlos masivamente (121).

Si bien utilizar métodos asexuales no representa ningún problema en países donde el cultivo ya es manejado a gran escala (8), en países donde la especie es de reciente introducción y cuando las cuarentenas impiden la importación de material enraizado -además del riesgo de propagar material enfermo mediante éstas técnicas- se requiere de otros métodos con alta proporción de multiplicación en un menor tiempo, que nos proporcionen una clonación de variedades selectas y que nos permitan su propagación durante todo el año. Un método que presenta estas características es la técnica de cultivo de tejidos vegetales in vitro (24, 25).

El cultivo de tejidos vegetales es una descripción genérica que abarca el cultivo en condiciones asépticas de

luz, temperatura y humedad controladas, siendo generalmente el principal objetivo el de lograr el desarrollo y producción de plantas íntegras (24, 25, 27).

El empleo de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales en aplicaciones agrícolas puede ser muy importante para México y para otros países en situación económica parecida a la de nuestro país. Uno de los aspectos fundamentales es la micropropagación de cultivares económicamente importantes, libres de patógenos, hecho que puede tener repercusiones significativas ya que se ha mostrado la rentabilidad económica de la aplicación comercial de estas técnicas (95).

En lo que respecta al género Rubus, se han logrado avances considerables mediante esta técnica, pero quedando aún muchos aspectos sin estudiar, de los que se derivan respuestas morfológicas y fisiológicas in vitro que deben ser estudiadas más profundamente para poder manejar las respuestas del tejido en una forma más productiva; estos factores involucran condiciones ambientales, requerimientos nutricionales y hormonales, etc. Estos hechos son los que fundamentan el presente proyecto.

Con base en las consideraciones anteriores se plantearon los siguientes objetivos:

- (1) Determinar las condiciones de cultivo in vitro para el establecimiento de las variedades 'Amber' y 'Heritage' de frambuesa roja y las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem' de zarzamora, incluyendo la metodología de desinfección, medios de cultivo y balance hormonal.
- (2) Establecer las condiciones para la propagación masiva, de estas variedades, evaluando el efecto de diferentes medios de cultivo, de la consistencia de éstos (sólida y líquida) y de la intensidad luminosa.
- (3) Obtener plantas completas estableciendo la influencia de la longitud y el grosor del brote en la inducción y desarrollo del sistema radical.

ANTECEDENTES

1. CLASIFICACION BOTANICA

La frambuesa y la zarzamora pertenecen a la familia Rosaceae, la cual comprende especies frutícolas de interés comercial, como son el manzano, el peral, el almendro, el durazno, el cerezo, etc. (16, 28, 57, 79, 99).

Las frambuesas y las zarzamoras son clasificadas taxonómicamente en el género Rubus, que consiste en un complejo y variado grupo de plantas compuesto de especies altamente heterogéneas y de híbridos (69, 83, 97, 99). Su sistemática es bastante complicada y aún es confusa, por lo que resulta difícil determinar con seguridad las diversas especies y su número (16). Focke en 1910-1914 (cit. 81) reporta entre 400 y 500 especies de este género, además de una cantidad indefinida de entidades espontáneas intermedias originadas por hibridación (16). Posteriormente Bailey de 1941-1945 (cit. 69) reconoció arriba de 350 especies de zarzamora y Larsson (1969) cita 117 especies de frambuesa. Rzedowski (97) estima entre 250 y 700 el número de especies de Rubus.

El género Rubus comprende 12 subgéneros de acuerdo con Focke (1910-1914 cit. 57). Los subgéneros Idaeobatus y Eubatus contienen respectivamente las frambuesas y las zarzamoras. Una diferencia básica para distinguirlas es la de que al cosechar los frutos maduros de la frambuesa se separan del receptáculo, mientras que en la zarzamora el receptáculo viene adherido al fruto (16, 54, 69, 83, 96).

Entre las especies agrónomicamente importantes de frambuesa se encuentran: Rubus idaeus (frambuesa roja originaria de Europa); R. strigosus que crece en América Septentrional y de las que se derivan las principales variedades de fruto rojo; R. occidentalis o frambuesa negra (16, 90); y de zarzamora: R. fruticosus (R. ulmifolius Schott, contiene cultivares erectos); R. saxatilis (zarzamora herbácea con rizoma leñoso); R. laciniatus (originaria de Europa) y R. procerus (16).

2. DESCRIPCION BOTANICA

2.1. Características del género Rubus

Son hierbas o arbustos que llegan a alcanzar alturas hasta de dos o tres metros, tienen tallos que pueden ser

erguidos, rastreros o trepadores que generalmente están guarnecidos por espinas o cerdas, aunque existen variedades de corteza completamente lisa. La mayoría produce cañas bianuales pero unas pocas especies consisten de cañas perennes. Presentan hojas alternas o saliendo en fascículos, pecioladas, estípulas unidas a la base del peciolo, láminas simples a lobadas o compuestas con tres a siete folíolos. Sus flores son generalmente perfectas, en racimos o panículas grandes y vistosas, a veces solitarias, hipantio corto, bracteolas ausente con cinco sépalos y pétalos generalmente; los estambres son infinitos y tienen filamentos delgados. Presentan estilos subterminales y carpelos sobre un receptáculo convexo (con dos óvulos, uno abortivo) en números muy superiores a cinco. El fruto consiste de numerosas drupitas que forman agregados. La reproducción varía desde apomíctica a sexual. La producción de frutos bien formados depende en alto grado de la polinización de abejas y avispas, siendo por lo tanto pseudógamas (4, 16, 40, 83, 90, 96, 97, 99).

2.2. Características de la frambuesa

Esta especie se caracteriza por presentar pubescencia en tallos, drupelas y envés de la hoja; sus tallos están generalmente cubiertos con agujones. Las drupelas son coherentes y en la maduración se separan del receptáculo (83).

La frambuesa roja (Rubus idaeus L.) es un arbusto de altura variable entre 100, 200 cm y más; cada año emite desde la raíz perenne numerosas ramas bienales más o menos erectas. Las hojas compuestas de tres a cinco elementos, lanceoladas ligeramente y segmentadas en el borde, tienen un peciolo espinoso y largo de 2 a 4 cm. La lámina superior de la hoja es verde, la inferior blanca tomentosa. Las hojas de las cañas vegetativas pueden tener a veces dimensiones notables hasta de 25 cm con segmentaciones trilobadas (16).

Las flores agrupadas en cimas de 2 a 5 flores son de pequeñas dimensiones y formadas por cinco sépalos verdes triangulares, por cinco pétalos blancos y por numerosos estambres, estilos y carpelos. Desde estos últimos se originan las drupelas reunidas sobre el receptáculo a formar la mora subésterica de color rojo. Existen variedades que producen una sola vez al año, y variedades reflorentes que pueden dar producción dos veces al año, una en primavera y otra en otoño (16, 68, 90) (Figura 1).

2.3. Características de la zarzamora

Como la frambuesa, las plantas de zarzamora tienen raíz perenne y ramas bienales, las cuales generalmente lignifican y llegan a alcanzar longitudes de tres metros (16, 102, 110).

Los tallos de *R. fruticosus* L. tienen superficie acanalada y espinas derechas (aunque existen variedades sin espinas) las hojas palmadas de 3 a 5 segmentos presentan la hoja superior de color verde oscuro y pueden quedarse todo el año en la planta (16).

Las flores unidas en un número de 20 a 30 y más en un arreglo piramidal tienen una corola con cinco pétalos que miden de 2 a 3 cm de ancho, presentan colores que van desde el blanco al morado y el rosado. Los estambres son numerosos, superiores a 100. Las flores producen una considerable cantidad de néctar y son muy visitadas por insectos (16, 83).

Los frutos son drupas aromáticas de sabor agradable. Las drupelas unidas, adheridas al receptáculo, forman la drupa compuesta llamada mora. El receptáculo de color blanco es generalmente cilíndrico o cónico (16, 102). Las semillas, incluyendo el endocarpio pétreo, son de 2 a 3 mm de longitud y de 2 a 4 mg de peso. Cuando crecen bajo sombra densa, la mayoría de las especies de zarzamora no forman semillas (4).



Figura 1. Frutos de frambuesa de la variedad 'Amber' (*Rubus idaeus* L.).

3. DISTRIBUCION

El género Rubus se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo y se han encontrado especies en diversos hábitats y sobre un amplio rango geográfico (58). Se distribuyen principalmente en regiones frías y templadas del Hemisferio Norte (zona templada de Europa, Norte América, China, Japon y la región del Himalaya), algunas han sido encontradas en regiones montañosas y más allá del Círculo Artico y en muchas islas oceánicas (particularmente de Nueva Zelanda) (16, 69, 81). En la figura 2a se presentan las zonas mundiales de dispersión del material silvestre (83, 84).

Existe por lo tanto, un amplio rango de potencialidad de características útiles, tales como la resistencia al frío de las especies Rusas y del Norte de Suecia, como Rubus arcticus (15, 57, 58), el tamaño de fruto grande de especies de Sudamérica, la temprana maduración y la larga estación de fructificación de especies de Japon y Corea (58), así como también cultivares adaptados a regiones subtropicales, montañosas y planicies de Israel (107).

En México se han reportado 29 especies silvestres de frambuesas y zarzamoras, tanto rojas como negras ampliamente difundidas en varios estados, que abarcan desde Sonora y Chihuahua hasta Veracruz, Oaxaca y Chiapas (83, 84) (Ver figura 2 b). Anadado a lo anterior, cultivares europeos de los cuales se creyó que no se adaptarían a las condiciones climáticas del país, han presentado buena adaptación (96).

El género Rubus, asimismo, constituye parte de la flora característica de la cuenca del Valle de México (97).

4. ORIGEN

4.1 Antecedentes citotaxonómicos

Dentro del género Rubus tres secciones contienen frutales cultivados. Son: Idaeobatus (incluye las frambuesas); Eubatus (incluye las zarzamoras) y Cylactis que incluye las especies herbáceas norte-circumpolares y alpinas. Un cuarto grupo, Anaplobatus (incluye las frambuesas florescipientes) también ha sido utilizado en cultivos y programas de mejoramiento. Su número cromosómico básico es 7 y las especies de Rubus varían desde formas diploides ($2n=14$) a dodecaploides ($2n=84$) (53, 58, 69, 79, 103).



a. Zonas mundiales de dispersión del material silvestre.



b. Zonas nacionales de dispersión del material silvestre.

Figura 2. Distribución del género Rubus. (Fuente: B3, B4).

Las frambuesas cultivadas se originan de tres especies o subespecies diploides: Rubus idaeus o R. idaeus vulgatus, la frambuesa roja del norte de Europa y Asia; R. strigosus o R. idaeus strigosus, la frambuesa roja de Norteamérica y R. occidentalis la frambuesa negra también nativa de Norteamérica pero generalmente distribuida más al sur que R. strigosus (16, 53). Las formas silvestres de R. idaeus y R. strigosus se han utilizado típicamente para el mejoramiento. La fertilización es controlada por tipos opuestos multialélicos de sistemas gametofíticos incompatibles y por lo tanto son altamente heterocigóticos (Keep, 1968 cit. 53). La domesticación involucra el crecimiento de monocultivos clonales y por lo tanto demandan selecciones formadas auto-compatibles, pero la incompatibilidad unilateral interespecífica mostrada en cruza con R. occidentalis sugiere que sólo el polen ha cambiado, mientras que el estilo ha retenido su actividad (53, 80).

Tres grupos de zarzamoras han sido domesticadas. El primero contempla las zarzamoras europeas extendidas por toda Europa y gran parte de Asia; incluyen un gran número de formas poliploides, principalmente tetraploides, que pueden considerarse convenientemente como una sola población caracterizada por la diversidad morfológica y diferenciación ecológica. Los únicos sobrevivientes diploides primarios son R. tormentosus y R. ulmifolius. En el segundo están las zarzamoras erectas americanas del este y rastreras ("dewberries") las cuales incluyen un gran número de formas poliploides además de cinco especies primarias diploides: R. allegheniensis, R. argutus, R. setosus, R. cuneifolius y R. trivialis. El tercero abarca dos zarzamoras rastreras americanas del oeste que geográficamente están separadas por praderas y montañas y tienen números cromosómicos muy altos, 56 y 84 son los más comunes. Su origen es poco entendido, debido a que no hay rastros de niveles de ploidía, pero el área muestra una considerable diversidad de otras secciones de Rubus y parece ser que los primeros progenitores de este grupo de zarzamoras cambiaron diversos genomas de éstos. Este grupo tiene probablemente el origen más complejo de todas las zarzamoras (53). La ausencia de espinas es encontrada en zarzamoras tetraploides o de menor número cromosómico, y raramente en niveles altos de ploidía excepto para mutaciones o quimeras naturales (16, 58, 86).

4.2. Historia y centros de origen

4.2.1. Frambuesas (Idaeobatus)

El este de Asia es considerado el centro de origen para Idaeobati y hace aproximadamente 450 años se introdujeron a Europa las primeras frambuesas para su cultivo

(81).

A principios de la era Cristiana, Plinio escribió de las frambuesas silvestres llevadas del Monte Ida; un informe sin duda llevado a Linneaus para dar a la planta su nombre botánico (81).

El primer registro de frambuesas cultivadas data de 1548 y es atribuido a Turner, un botánico inglés. El primer escrito extensivo fue un capítulo dedicado a las frambuesas por Parkinson en 1629. En 1771, William Prince del 'Flushing Landing' de Nueva York fue el primero en vender plantas de frambuesa comercialmente en Estados Unidos. En 1790 se vendieron cuatro cultivares, dos derivados de especies europeas y dos de especies americanas; además publicó aspectos detallados de las frambuesas (54, 81).

A fines del siglo XVIII, cultivares de frambuesa roja se importaron de Europa a Estados Unidos debido a que éstos producían frutos más grandes y de mejor calidad que las formas americanas. Al mismo tiempo se seleccionaron plantas a partir de especies silvestres, se importaron semillas y cultivares y se hicieron cruces para obtener formas más promisorias (81).

4.2.2. Zarzamoras (Eubatus)

En su hábitat natural, las especies de Eubatus, que incluyen las zarzamoras cultivadas, fueron usualmente encontradas en los márgenes de bosques, ríos y claros. El retiro de los glaciares en Europa y Norteamérica abrió grandes áreas de colonización para el género. Más recientemente la tala de los bosques por el hombre en Norteamérica sirvió para el mismo propósito (Darrow, 1937 cit. 81, 85).

Gustafsoon (1942, cit. 78) presentó evidencia que sustentaba la hipótesis de que hubo dos centros de origen principales para la zarzamora, nombrados el este de Norteamérica y Europa. Dividió el subgénero en dos grupos complejos, Morferi veri y Corylifolli. El complejo Morferi veri consiste de cinco especies primarias diploides. Estas especies se han inter cruzado, llevando a una duplicación cromosómica y apomixis, e incrementando el complejo de híbridos que se encuentran dispersos en Europa y Asia (81).

Debido a que la mayoría de las zarzamoras son silvestres y usualmente ruderales en muchas partes del mundo, su uso limitado en el pasado pudo deberse a su corteza espinosa, característica que hace difícil su manejo (69, 85). Los aztecas las llamaron coatlanti o coatlamiti por la semejanza de sus espinas con los colmillos de víbora (83,

En los años treinta del siglo XIX, dos cultivares se seleccionaron del campo, 'Lawton' y 'Dorchester', y fueron introducidos en los años cincuenta del mismo siglo; contribuyeron grandemente a desarrollar el interés por seleccionar y cultivar zarzamoras en Norteamérica. Nuevos clones aparecieron pronto, algunos seleccionados del campo y otros resultantes de la siembra de semillas de polinización abierta y de la hibridación actual, resultando así el principio de una industria comercial (53, 69).

5. CULTIVO DE LA FRAMBUESA Y ZARZAMORA

La frambuesa y la zarzamora son, en general, muy similares en sus requerimientos edáficos y climáticos, e su forma de cultivo, en su almacenamiento, etc.

5.1. Clima

La frambuesa es una planta de lugares templados más que cálidos, las llanuras calientes no le favorecen, por lo que debe cultivarse preferentemente en alturas de 1000 a 1200 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) (2, 16, 93). En general requiere de 700 a 1700 horas frío (abajo de 7° C), pero algunas variedades se desarrollan bajo condiciones de inviernos benignos, con acumulaciones de frío que varían de 400 a 600 horas frío (96). Sin embargo, estudios donde el frío de invierno se suponía insuficiente para cubrir los requerimientos de la frambuesa, han mostrado que el tratamiento con cianamida mejora el rompimiento del letargo de las yemas, además de incrementar significativamente la cosecha y de anticipar el periodo de la misma (107).

La zarzamora es más tolerante al clima, adaptándose a una escala de condiciones más amplia que las anteriores y crece preferentemente en altitudes de 600 a 700 m.s.n.m. (16, 60, 83, 84, 102).

5.2. Suelo

Una ladera bien expuesta, de suelo profundo y fresco, es propia para la explotación industrial de estas especies. Los terrenos graníticos son particularmente buenos, siempre

que contengan hierro y cal en cantidad moderada y suficiente humus. El pH en el cual prosperan es 5.5 a 7.0 (el pH ideal se considera de 6.5). Los suelos con textura franca y franco-arcillosa, de aluvión o aún arenosos son apropiados, pero lo fundamental es un buen drenaje (16, 83, 93, 96, 114), siendo por lo tanto de mayor importancia las características del subsuelo que las de la superficie (2).

Asimismo, la frambuesa y la zarzamora presentan la ventaja de poder desarrollarse en terrenos tan dispares como las laderas de montañas, terrenos pedregosos y diversos tipos de suelos (16).

5.3. Cultivo

Se planta con una densidad de 4,000 a 5,000 plantas por hectárea; se emplean brotes de un año y se plantan a 15 ó 20 cm de profundidad, en filas diferentes entre sí 2.50 m y sobre fila 0.5 a 1.0 m (16, 93, 114).

Su cultivo es sencillo. Complementariamente se pueden utilizar las entrefilas de la plantación cultivando hortalizas. También se pueden cultivar frambuesas y zarzamoras en las huertas de árboles frutales simultáneamente, como cultivo intercalar, antes de que las plantas arbóreas hayan alcanzado su completo desarrollo y producción. La vida media de una población de frambuesa y zarzamora es al menos de seis años; puede llegar a durar hasta 20 años y siempre es convenientemente remuneradora, ya que produce más de 5000 kg por hectárea de fruto. Cada nueva fructificación reduce los costos de producción, aunque hay que enfatizar la importancia de la sanidad de las plantas para obtener el máximo rendimiento del cultivo (16, 83, 93, 114).

5.4. Cosecha y Almacenamiento

Se deben cosechar sólo aquellos frutos maduros que se desprendan fácilmente y enteros, depositándolos en recipientes pequeños sin rebordes en las paredes para evitar el deterioro de la calidad. Inmediatamente después de ser cosechados deben ser llevados lo más pronto posible al centro de consumo o a la planta de procesamiento. Debido a que la calidad del fruto no refrigerado se deteriora rápidamente cuando se mantienen a 26° C más de 24 horas, si es necesario almacenarse, deberán mantenerse a temperaturas de -0.5° a 0° C y una humedad relativa de 85 - 95 % (39, 96, 103).

6. USOS DE LA FRAMBUESA Y ZARZAMORA

Las frambuesas y las zarzamoras han sido los frutos de jardín favoritos de Europa y Norteamérica durante varios siglos y actualmente se están convirtiendo en un cultivo comercial importante, principalmente para la producción de mermeladas, yogurth, saborizantes, etc. (53). De acuerdo con informes de la F.A.O., en 1981 la producción a nivel mundial fue de más de noventa mil toneladas de frambuesa al año (16).

La importancia económica de estos frutos se debe a las cualidades por las que se consideran frutos finos de mesa, éstas son su sabor dulce y agradable y su aroma característico (114). Por otra parte, su valor nutritivo es alto, es comparable al de la fresa (114); tienen además las mismas cualidades vitamínicas de la naranja o del limón, pero sobrepasa a éstos por su valor calorífico. Sus frutos son ricos en sales minerales, en primer lugar en las de calcio -que están contenidas en una proporción que no alcanzan otros frutos- de magnesio y de hierro (13) (Tabla 1).

Los frutos pueden consumirse en estado fresco o como uno de los muchos productos procesados. La mayoría de la frambuesa y zarzamora se industrializa, principalmente en la producción de jaleas y mermeladas (aproximadamente 70 % de la producción total, en menor escala se emplea en la fabricación de helados y yogurth -industria creciente y de rápida expansión que ha sido vista como una nueva salida potencial para estos frutos- saborizantes, vinos y licores, y su empleo en repostería (pasteles, pays, chocolates, etc.) se ha incrementado en los últimos años. Sus esencias se usan en jarabes medicinales y refrescos. Asimismo, la industria cosmética emplea una pequeña parte de los colorantes y aromas naturales extraídos (13, 16, 66, 105, 114). Las frambuesas y especialmente sus bebidas tienen propiedades refrescantes, se dice que favorecen la transpiración y secreción urinaria. Posee un discreto poder laxante, sin embargo, en cantidad excesiva son laxantes y pueden causar cólicos (16, 114). Algunas zarzamoras son utilizadas para la producción de jugos, aunque la importancia del jugo de zarzamora es mucho menor. Los vinos y brandies de zarzamora han sido populares por muchos años junto con los extractos y esencias (114).

Del fruto se extraen además tintes añil y azul marino, aunado a que la planta tiene gran cantidad de taninos que se utilizan como colorantes de telas. Completando el uso integral que se puede dar a estas especies, las hojas así como los vástagos tiernos, son usados como forraje de ovejas y cabras y de las cenizas de los troncos se extrae pntasa (114).

TABLA 1. Composición química y valor energético de la frambuesa y zarzamora por cada 100 g de parte comestible.

	Frambuesa (<u>Rubus idaeus</u>)	Zarzamora (<u>Rubus fruticosus</u>)
Parte comestible (g)	100.0	100.0
Calorías	40	37
Agua (g)	80.0	80.0
Proteínas (g)	1.0	0.9
Lípidos (g)	0.6	1.0
Glúcidos (g)	8.0	6.0
Celulosa (g)	6.0	9.0
Elementos minerales (mg)		
Fósforo	30.0	34.0
Magnesio	20.0	26.0
Calcio	40.0	17.0
Hierro	0.75	1.0
Cobre	0.13	0.16
Manganeso	0.51	0.59
Vitaminas (mg)		
Ácido ascórbico	de 15.0 a 37.3	de 24.0 a 37.0
Tiamina (B1)	0.025	0.03
Riboflavina (B2)	0.06	0.05
PP	0.40	0.40
Ácido pantoténico	0.22	0.15
Carotenoides	0.08	0.10

(Fuentes: 13, 15, 16)

7. METODOS DE PROPAGACION TRADICIONAL

Tradicionalmente las plantas de frambuesa y zarzamora se han propagado utilizando una variedad de técnicas asexuales y muy diferentes tipos de material vegetativo, entre los que se encuentran: enraizado de tallos aéreos o esquejes; el acodado simple, por rizomas, etc. (8, 21, 40, 60, 83, 103, 115). Asimismo, las cañas pueden inducir raíces en sus ápices, cuando se excluye la luz del ápice durante el verano y se cuida que no mantengan la posición vertical (4).

La forma de reproducción sexual se utiliza únicamente con fines de mejoramiento debido a la baja germinación y emergencia tardía de las plántulas. La mayoría de las especies de Rubus producen sus semillas por pseudogamia (es decir, la polinización es esencial pero no hay fusión de las células sexuales masculinas y femeninas). Ferr (1954, cit. 4) encontró en tres especies de Rubus que arriba del 65 % de las semillas tenían embriones colapsados y Amor (1967, cit.4) reportó que 28 % de las semillas colectadas de R. procerus no contenían embrión (4, 83).

La germinación de las semillas de Rubus puede ser mejorada moviendo o suavizando el duro endocarpio con ácido sulfúrico fumante por 15-30 minutos y por estratificación a 3-5 C durante dos a tres meses (4, 62, 70).

8. CULTIVO IN VITRO DE RUBUS

La técnica de cultivo de tejidos in vitro ha sido exitosamente utilizada en el género Rubus, a partir de la siembra de ápices de brote, yemas axilares, raíces, frutos partenocárpicos, óvulos y semillas (19, 28, 35, 55, 104, 106, 109, 112).

La micropropagación y/o cultivo de meristemas y ápices de brotes ha sido el aspecto más estudiado en el cultivo in vitro de especies comercialmente importantes de la familia Rosaceae, como son la frambuesa y la zarzamora, que son propagadas comercialmente en países de Europa, en Estados Unidos y en Canadá (28).

La metodología de desinfección de ápices de brotes de Rubus ha sido similar a la empleada con otras Rosáceas, utilizando etanol por unos segundos, hipoclorito de sodio (soluciones comerciales) o hipoclorito de calcio con agentes emulsificadores durante 10 ó 15 minutos, seguidos por enjuagues con agua destilada estéril (19, 28, 44, 78, 91,

104, 106). Cabe señalar que en la mayoría de los trabajos con Rubus, se ha utilizado material vegetativo que se encontraba creciendo en invernaderos bajo condiciones fitosanitarias controladas, por lo que algunos autores han hecho desinfecciones aún menos drásticas (etanol al 70 y 95 % por unos segundos), obteniendo buenos resultados (92, 118).

El tiempo de desinfección ha sido aumentado a 30 minutos por algunos autores que han utilizado zarzamoras procedentes de campo. Carrillo y Mendoza (22) utilizaron yemas axilares de zarzamora, variedad 'Himalaya', y obtuvieron más del 50 % de contaminación. Babić y Nesković (9) precedieron el tratamiento de desinfección con un baño de fungicida, pero no señalan el índice de contaminación obtenido (9).

Los primeros intentos en la propagación de plantas de frambuesa in vitro estuvieron enfocados a producir plantas libres de microorganismos patógenos (109, 112). Schellunova y Popov en 1970 (101) y Putz en 1971 (91) obtuvieron éxitos parciales al utilizar ápices de frambuesa, ya que no lograron la propagación a gran escala. Putz utilizó el medio basal de Murashige y Skoog (MS) (1962) implementado con sustancias naturales (agua de coco al 10 %).

Broome y Zimmerman en 1978 (19) cultivaron ápices de brotes en activo crecimiento, con 2 a 4 hojas, de cuatro variedades de zarzamora sin espinas, 'Black Satin', 'Dirksen Thornless', 'Smoothstem' y 'US64-39-2', en medios de cultivo líquidos con las sales basales MS complementados con 0.4 mg/l de Tiamina-HCl, 100 mg/l de mio-inositol, 1.0 mg/l de bencil amino purina (BA); 0.1 mg/l de GA3; 1.0 mg/l de ácido indol butírico (IBA) y 30 g/l de sacarosa. Este medio favoreció el establecimiento de los explantes más que el medio con agar. Aunque posteriormente fueron trasplantados a medio agarizado, donde obtuvieron una rápida proliferación, produciendo de 20 a 40 brotes de cada yema axilar.

Carrillo y Mendoza en 1979 (22) cultivaron yemas axilares de zarzamora var. 'Himalaya', provenientes de campo, para conocer el efecto de varios productos naturales (agua de coco, aguamiel y miel de abeja), pero sólo obtuvieron desarrollo de tejido calloso.

En 1979, Huth y Rover (cit. 109) encontraron que las plantas de frambuesa en cultivos in vitro proliferaban en un medio con la adición de BA, pero el número de plantas a partir de un explante no excedía de tres a cinco en sus investigaciones. En 1980, Anderson (6) obtuvo resultados similares y propuso un medio basal para la propagación de frambuesa, el cual es básicamente una reducción de los macroelementos del medio MS con el doble de las sales de fierro.

Donnelly et. al. en 1980 (28) cultivaron in vitro plantas

de frambuesa negra cultivar 'Munger'; zarzamora sin espinas (R. *loganobaccus* Bailey) y frambuesas rojas cultivar 'Meeker', 'Williamette' y siete selecciones. Para la propagación se usaron las sales basales de Linsmaier y Skoog (LS), y para estimular la proliferación se probaron diversos niveles hormonales de BA y IBA. La zarzamora sin espinas y las siete selecciones de frambuesa roja tuvieron una alta proporción de sobrevivencia cuando se establecieron en un medio sin Cisteína-HCl y sin hormonas, y un mes después fueron subcultivadas a un medio con BA y IBA. Cuando los meristemas fueron establecidos en el medio con hormonas el porcentaje de sobrevivencia disminuyó, pero la proporción de crecimiento de las que sobrevivieron aumentó.

Las zarzamoras sin espinas también han sido propagadas in vitro por enraizamiento de esquejes con un nódulo (11).

En 1980 James et. al. (49) utilizaron el medio basal LS suplementado con BA y IBA para propagar 12 selecciones de frambuesa roja y un cultivar. La adición de floroglucinol (FG) a una concentración de 162 mg/l produjo un incremento significativo (aproximadamente el doble) en el número de brotes producidos en todas las concentraciones hormonales, probadas aunque la concentración óptima fue de 1.0 mg/l de BA y de 0.1 mg/l de IBA.

Fyott y Converse en 1981 (92) emplearon los cultivares 'Williamette', 'Canby', 'Fairview' y 'DR-US-1835' de frambuesa roja, sometiendo las plantas a un tratamiento previo de termoterapia (8 semanas a 37 C) y sembraron nodos meristemáticos con el objetivo de obtener plantas libres de virus; aunque no obtuvieron proliferación a gran escala ya que sólo reportan que "algo de proliferación ocurrió después de dos meses". Utilizaron el medio de cultivo recomendado por Anderson (cit. 92) con 1/4 de la concentración de los macroelementos del medio MS, suplementado con 1.0 a 3.5 mg/l de BA y 0.05 mg/l de IBA.

Para la propagación de frambuesa roja, Snir (108) utilizó el medio de cultivo de Boxus, reemplazando los microelementos por los del medio MS. A las cuatro semanas, la roseta que se había formado se transfirió a un medio sin reguladores de crecimiento, en donde produjo un brote con varias yemas, el cual fue cortado en microestacas de dos nudos cada una para posteriores subcultivos.

Slivinski y Freece en 1984 (106) utilizaron el medio recomendado por Broome y Zimmerman (19) para micropropagar explantes de nódulo simple de zarzamoras sin espinas, teniendo éxito al establecer los explantes en un medio sólido y obteniendo una alta proliferación de brotes (mayor del 90 %). Babić y Nesković (9), en el mismo año, también obtuvieron éxito al cultivar ápices de brotes y meristemas de diversos cultivares de zarzamoras sin espinas (Rubus *caesius* L.) para obtener de plantas libres de virus.

Sobezykiewicz en 1984 (109) modificó el medio MS, adicionando el doble de las sales de hierro, 50 mg/l de ácido ascórbico y 4 mg/l de BA para propagar los cultivares 'Canby', 'Norna' y 'Veten' de frambuesa. Se produjeron rosetas 7 a 10 días después de la siembra y 5 a 6 semanas más tarde, 98 - 100 % de las rosetas proliferaron y obtuvieron de 4 a 18 brotes por inóculo dependiendo del cultivar.

En 1985, Avitia (8) propagó 10 selecciones de frambuesa roja, provenientes del cultivar 'Malling Exploit', utilizando las sales basales de Anderson (6) y de 0.4 a 0.8 mg/l de BA. Obtuvo un promedio de 4 a 5 brotes por inóculo, observando diferencias entre selecciones en respuesta a la proliferación. Ese mismo año, Wellander (118) propagó el cultivar 'Veten' de frambuesa roja (*R. idaeus* L.) reduciendo a la mitad la concentración del nitrato de amonio y el nitrato de potasio del medio MS, suplementado con 1.0 mg/l de BA; y obtuvo un promedio de 5 a 6 brotes por explante inicial. Antes de enraizar los brotes, éstos fueron cultivados en un medio de elongación que contenía de 0.5 a 3.0 mg/l de GA3 sin encontrar diferencias respecto a los testigos. El tratamiento con GA3 retrasó el desarrollo de raíces cuando los brotes se establecieron in vivo.

El enraizamiento de los brotes de Rubus se ha llevado a cabo tanto en condiciones in vitro como en condiciones ex vitro (8).

Broome y Zimmerman en 1978 (19) con cuatro variedades de zarzamoras sin espinas obtuvieron 64 % de enraizamiento, en el mejor tratamiento, en medios de cultivo MS agarizado, sin citocininas ni giberelinas y diferentes concentraciones de auxinas; mientras que enraizando directamente los brotes con una mezcla comercial de auxinas (Rootone F) en musgo, bajo niebla intermitente, obtuvieron 90 % de enraizamiento.

James et. al. (47) en 1978 enraizaron todos los brotes híbridos de Rubus in vitro en medios MS con IBA y FG; el enraizamiento no se manifestó sino hasta después de 30 días.

En 1980, Zimmerman et. al. (121) probaron siete sustratos para enraizar zarzamora sin espinas obteniendo mejores resultados en las mezclas de musgo-perlita y arena-musgo sin encontrar interacción entre el IBA y el medio de enraizamiento.

Pyott y Converse en 1981 (92) utilizaron arena como sustrato para inducir la formación del sistema radical en frambuesa roja, enraizando 10 de 13 explantes en invernadero bajo niebla intermitente, y utilizando enraizador comercial conteniendo 0.1 % de IBA.

Skirvin et. al. en 1981 (104), con tres variedades de zarzamoras rastreras sin espinas, 'Thornless Boysenberry', 'Thornless Youngberry' y 'Thornless Evergreen', utilizando

enraizador comercial (Rootone F) y dos tipos de sustratos obtuvieron que sólo 1 de 23 brotes en pastillas de turba (Jiffy 7) sobrevivió, mientras que 15 de 21 brotes plantados directamente a suelo formaron sistema radical. Por otra parte, obtuvieron 80 % de enraizamiento in vitro al usar el medio MS a 1/16 de concentración de sus sales, y con diferentes niveles de ácido naftalen acético (NAA).

En 1984 Babić y Nesković (9) obtuvieron 100 % de enraizamiento con dos cultivares de zarzamora (*R. caseus* L.) cuando los brotes fueron sumergidos en una solución de 50mg/l de IBA durante 18 horas y después transferidos a medio sin hormonas. Slivinski et. al. (106) enraizaron directamente en musgo zarzamoras sin espinas bajo condiciones de alta humedad y obtuvieron un 90 % de enraizamiento.

Sobezikiewicz (1984) (109) empleó una mezcla de arena:musgo (2:1) para enraizar directamente en invernadero las variedades 'Canby', 'Norna' y 'Veten' de frambuesa, obteniendo raíces normales ramificadas a las cuatro semanas.

Gebhardt en 1985 (37) probó hule espuma con soluciones de medios nutritivos para enraizar in vitro frambuesa roja, cv. 'Gigant' y aunque obtuvo un alto porcentaje de enraizamiento (80 %) fue mayor el del testigo con medio de cultivo agarizado (85 %), además de que la raíz central de los brotes en hule espuma fue menos lignificada que los que se encontraban en medio con agar.

Otro aspecto de suma importancia dentro la micropropagación por medio del cultivo de tejidos vegetales, del cual depende el éxito final de la propagación de las plantas, es la transferencia de los brotes o plantas de condiciones in vitro a suelo (29).

Se han realizado estudios anatómicos de frambuesa roja transferidos de cultivos in vitro a suelo que han mostrado que las hojas de las plántulas formadas en cultivo fueron más pequeñas y compactas, además de que tuvieron mayores espacios intercelulares en comparación con las hojas formadas en plantas en suelo. Asimismo presentaron otras características, como menor número de tricomas y apertura más lenta de los estomas en las hojas de plántulas obtenidas in vitro respecto a las plantas en suelo; sin embargo, más de la mitad de las hojas del cultivo murieron al primer mes y algunas sobrevivieron hasta tres meses. Las nuevas hojas de las plántulas trasplantadas, formadas durante el primer mes en el suelo, presentaron características superficiales y anatómicas transicionales. Con el tiempo, en las condiciones del suelo, la apariencia de las hojas formadas subsecuentemente se aproximó a las control (18, 29) incrementando las tasas de fijación de dióxido de carbono y el contenido de pigmentos por unidad de área, lo cual ilustra la aclimatación a suelo, misma que depende del tiempo y requiere la producción de nuevas hojas para iniciarse

en el nuevo ambiente (30, 31).

Los tejidos persistentes del cultivo in vitro no mostraron, o mostraron poco cambio con el tiempo en el suelo, crecieron mínimamente y la deposición de las paredes ocurrió lentamente, mientras que los nuevos órganos formados después del trasplante mostraron un elevado incremento de tamaño y desarrollo. Durante la aclimatación se observaron formas transicionales de hojas, pecíolos, tallos y raíces. Esta tendencia es análoga a la secuencia normal de desarrollo de la formación de órganos (32).

También se han realizado estudios sobre la estabilidad fenotípica y el comportamiento en campo de variedades de zarzamora sin espinas propagadas por cultivo de tejidos. No se observaron diferencias consistentes en la fecha de floración y cosecha debido al método de propagación, aún cuando el primer año de crecimiento de las plantas propagadas in vitro fue más uniforme que el de las plantas propagadas por métodos tradicionales (113).

Asimismo, las técnicas de cultivo in vitro han sido utilizadas en el género Rubus en estudios de germinación de polen para conocer su porcentaje de viabilidad y su almacenamiento (87) y en estudios comparativos de los niveles de embriones abortivos en programas de hibridación; se han realizado cultivos de embriones de híbridos de zarzamora, que en condiciones naturales no se formarían, asegurando el desarrollo satisfactorio de las semillas y su germinación (35, 55).

Por otra parte, mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales, se han realizado estudios de bioquímica y fisiología en el género Rubus a partir de cultivo de callos y cultivos en suspensión (23). En 1983, Pilett *et. al.* (89) caracterizaron la lisozima en tejidos de R. hispidus; encontraron que su actividad está fuertemente relacionada con la expansión activa de las células en las que se formó. Un año más tarde, Pilett y Bernasconi (88) estudiaron las relaciones entre el crecimiento y contenido endógeno de lisozima en tejidos de R. hispidus cultivados in vitro en medio sólido y mostraron la actividad de la lisozima y cinetasa en cultivos en suspensión a partir de callo.

En virtud de las ventajas de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales in vitro, las perspectivas de su aplicación en el género Rubus son muy prometedoras, especialmente en el aspecto de la micropropagación, ya que se pueden obtener plantas libres de virus mediante el cultivo de meristemas, una propagación a gran escala de plántulas de alta calidad que se pueden desarrollar y producir normalmente en condiciones ambientales.

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIAL VEGETATIVO

Se utilizaron las variedades 'Amber' y 'Heritage' de frambuesa roja y las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem' de zarzamora, las cuales fueron colectadas de los campos experimentales de "San Martín" y "Montecillos" *. Se eligieron estas variedades con base en las características que a continuación se mencionan:

<<Amber>>. Es un cultivar de muy alta calidad, apreciado por sus frutos de color amarillo, de dimensión mediana, firmes y de exquisito sabor dulce. Su producción es elevada. Se adapta a regiones con inviernos benignos (7, 81).

<<Heritage>>. Es un cultivar rústico y vigoroso, adaptable también a suelos pesados, prefiere zonas cálidas y bien expuestas, con bajos requerimientos de frío y se desarrolla aun en condiciones subtropicales. Sus frutos son firmes, de dimensión mediana y aspecto atrayente, de color rojo claro brillante, de excelente calidad, fáciles de recolectar y con semillas pequeñas. La producción es elevada. Produce dos veces al año (a fines de la primavera y en otoño) y tiene hábitos de crecimiento erecto. Se recomienda para productos procesados (16, 81, 96, 107).

<<Himalaya>>. Es un cultivar que ha sido ampliamente utilizado en programas de hibridación y mejoramiento (pese a su corteza espinosa) por su bajo nivel de ploidía (4n) y por las características de sus frutos, grandes, firmes y de extraordinaria calidad (21, 81).

<<Smoothstem>>. Es un cultivar tardío muy vigoroso y productivo (más de 11 ton/ha) seleccionado en 1958 por Scott y Betsaville e introducida al comercio en 1966. Presenta frutos de medianas dimensiones (4-5 g) que son tiernos, ácidos, perfumados y de fácil recolección debido a su corteza sin espinas (16).

2. COLECTA DEL MATERIAL VEGETATIVO

Se colectaron varetas de 30 cm de longitud que contenían yemas vegetativas. Este material se encontraba en la etapa de crecimiento activo (que corresponde al periodo de abril a julio).

* Del Centro de Fruticultura del Colegio de Postgraduados, Chapingo.

Al cortar las varetas se eliminaron inmediatamente las hojas para evitar la deshidratación y se trasladaron al laboratorio envueltas en papel absorbente humedecido, dentro de bolsas de plástico para posteriormente realizar la siembra in vitro, previo tratamiento de desinfestación.

El material vegetativo se sembró lo más pronto posible, ya que su almacenamiento en refrigeración (con tratamientos con fungicida) no fue posible por más de cinco días, debido al alto porcentaje de contaminación que se presentó en los cultivos in vitro cuando el material fue almacenado durante mayor tiempo al mencionado anteriormente.

3. DESINFESTACION

Se realizaron pruebas preliminares de desinfestación con base en lo recomendado en trabajos anteriores (19, 28, 44, 78, 91, 92, 104, 106, 118), sin embargo, debido a que estos trabajos se realizaron con material proveniente de invernaderos, y dado que los métodos y productos desinfestantes utilizados varían de acuerdo a la especie, al cultivar, a las condiciones en que se desarrolla la planta donadora, a la época de siembra y al tipo y tamaño de tejido que se utilice como inóculo (8), fue necesario determinar una metodología eficaz de desinfestación con la finalidad de obtener los cultivos asepticos.

Las varetas se lavaron bajo el chorro de agua corriente y se cortaron en segmentos que contenían de una a dos yemas, y se lavaron nuevamente.

La desinfestación del material vegetativo se llevó a cabo bajo condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar. Se agregó alcohol etílico al 70 % v/v (41) durante cinco minutos y pasado ese tiempo se decantó y se adicionó el agente desinfestante, siendo tres los empleados para determinar cual es el más efectivo:

1. Hipoclorito de Sodio al 1.2% v/v (solución comercial al 20% v/v)
2. Peróxido de Hidrógeno al 10% v/v
3. Nitrato de Plata al 0.1% p/v

Estos agentes desinfestantes se eligieron con base en su alta efectividad y/o facilidad de remoción (20, 120).

A su vez, se probaron cinco tiempos de exposición para cada agente, los cuales fueron: 5, 10, 15, 30 y 45 minutos para la variedad 'Amber'; de acuerdo a los resultados preliminares obtenidos se probó únicamente el Hipoclorito de Sodio como agente desinfestante por 15, 30 y 45 minutos para las otras variedades. Para mejorar la efectividad de estos agentes se agregó 1 ml/l de jabón líquido (solución

comercial) como agente emulsificador (20).

Finalmente, el material vegetativo se enjuagó de 4 a 5 veces con agua destilada estéril, seguido de un enjuague con una solución estéril de L-Cisteína (50 mg/l), que es un efectivo agente antioxidante (82), permaneciendo en ésta solución hasta su siembra.

Se sembraron de 5 a 7 tubos con una yema o ápice por cada agente desinfectante y por cada tiempo de desinfección con tres repeticiones para cada variedad.

4. MEDIOS DE CULTIVO

La composición del medio de cultivo es un factor determinante para el establecimiento exitoso del cultivo (1, 73, 76, 82).

Para la fase de establecimiento y proliferación se probaron dos medios nutritivos diferentes (Cuadro 1) con algunas variaciones en la concentración de sus macroelementos (Cuadro 2), los cuales diferían entre sí en el tipo y/o concentración de sales inorgánicas. Se evaluó también la influencia de diferentes concentraciones hormonales en la etapa de establecimiento, utilizando los reguladores de crecimiento: bencil amino purina (BA) como citocinina y el ácido 3-indol butírico (IBA) como auxina, y se probaron además medios de cultivo con consistencia agarizada y no agarizada.

Se utilizaron los medios basales de Murashige y Skoog (1962) [MS] con las modificaciones en sus componentes orgánicos de Broome y Zimmerman (1978) (19, 75) y el de Anderson (1980) [A] recomendado por Avitia (1985) (6,7, 8). En el Cuadro 1 se especifica la composición de los medios nutritivos basales. Los componentes orgánicos que se utilizaron para la etapa de establecimiento y proliferación se especifican en el Cuadro 3.

Para la fase de establecimiento se probaron diferentes tratamientos hormonales de BA/IBA para las cuatro variedades estudiadas, utilizando las concentraciones de 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mg/l de BA y manteniendo la concentración de 0.1 mg/l de IBA (se realizaron pruebas preliminares con 0.0 y 1.0 mg/l de IBA). Se probaron otras concentraciones intermedias entre 0.0 y 2.5 mg/l de BA con 0.0 y 0.1 mg/l de IBA para la variedad 'Amber' de frambuesa y concentraciones menores a 1.0 mg/l de BA para la variedad 'Smoothstem' de zarzamora. De esta manera se seleccionó el mejor tratamiento para la etapa de adaptación del tejido a condiciones in vitro. Se probaron medios líquidos, con puente de papel como soporte, y

Cuadro 1. Composición de los medios basales de Murashige y Skoog (1962) y de Anderson (1980).

Reactivos	Murashige y Skoog mg/l	Anderson mg/l
<u>Nitratos</u>		
NH ₄ NO ₃	1650.0	400.0
KNO ₃	1900.0	480.0
<u>Sulfatos</u>		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370.0	370.0
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3	---
MnSO ₄ · H ₂ O	---	16.9
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	8.6
CuSO ₄ · 6H ₂ O	0.025	0.025
<u>Halógenos</u>		
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440.0	440.0
KI	0.083	0.30
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	0.025
<u>Fosfatos</u>		
KH ₂ PO ₄	170.0	---
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	---	380.0
<u>Boratos</u>		
H ₃ BO ₃	6.2	6.2
<u>Molibdatos</u>		
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.025	0.025
<u>NaFeEDTA</u>		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	55.7
Na ₂ EDTA	37.3	74.5

Cuadro 2. Medios de cultivo basales utilizados para la etapa de establecimiento y proliferación de brotes.

Medio de cultivo	A-1 (Anderson)	A-2 (MS*)	A-3 (MS*)	MS-1 (MS)	MS-2 (MS*)	MS-3 (MS*)
Reactivos	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
<u>Nitratos</u>						
NH ₄ NO ₃	400.0	825.0	412.5	1650.0	990.0	412.5
KNO ₃	480.0	950.0	475.0	1900.0	1140.0	475.0
<u>Sulfatos</u>						
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370.0	185.0	92.5	370.0	222.0	92.5
<u>Fosfatos</u>						
KH ₂ PO ₄	---	85.0	42.5	170.0	102.0	42.5
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	380.0	---	---	---	---	---
<u>NaFeEDTA</u>						
FeSO ₄ · 7H ₂ O	55.7	55.7	55.7	27.8	27.8	27.8
Na ₂ EDTA	74.5	74.5	74.5	37.3	37.3	37.3

* Únicamente se enlistan los reactivos que fueron modificados del medio MS. El resto de las sales inorgánicas se adicionó en la cantidad indicada en el Cuadro 1 según el medio señalado entre paréntesis.

Cuadro 3. Medios de cultivo utilizados para el establecimiento y proliferación de variedades selectas de frambuesa y zarzamora.

	Establecimiento	Proliferación
Medio basal (frambuesas)	A-3, MS-1	A-1, A-2, A-3
Medio basal (zarzamoras)	A-3, MS-1	MS-1, MS-2, MS-3

Componente	Cantidad utilizada por litro de medio	
Tiamina-HCl	0.4 mg	0.4 mg
Mio-inositol	100.0 mg	100.0 mg
L-Cisteína	100.0 mg	100.0 mg
BA	0.0-5.0 mg	0.8 mg
IBA	0.0-1.0 mg	---
*GA ₃	0.1 mg	---
Sacarosa	30.0 g	30.0 g
**Agar	6.0 g	6.0 g
pH	5.7	5.7

* Acido giberélico

** Para los medios de cultivo con consistencia sólida.

sólidos (agarizados) para determinar la influencia del sustrato durante el establecimiento y proliferación de brotes.

Para la etapa de proliferación de brotes se empleó la concentración hormonal recomendada por Avitia (7), de 0.8 mg/l de BA, sin la adición de auxinas y se varió la concentración y tipo de sales inorgánicas del medio nutritivo, probando la respuesta de las dos variedades de frambuesa a los medios A-1, A-2 y A-3 y de las variedades de zarzamora a los medios MS-1, MS-2 y MS-3 (Cuadro 2).

El medio de cultivo se esterilizó a 120 C a una presión de 1.5 atmósferas, durante 15 minutos (61, 67).

5. ESTABLECIMIENTO A CONDICIONES IN VITRO

La elección del tejido que se usará como inóculo, para iniciar el cultivo in vitro es uno de los principales factores que debe considerarse (61, 73, 76).

Se utilizaron ápices meristemáticos debido a que éstos, cultivados en un medio adecuado, pueden regenerar plántulas completas más rápidamente que los tejidos de otras fuentes, y las plantas regeneradas usualmente retienen las características de sus progenitores debido a la naturaleza diploide de sus células meristemáticas (74, 77); además la propagación de plantas a partir de yemas o ápices meristemáticos puede llevarnos a obtener plantas libres de virus, lo cual ha sido uno de los mayores logros conseguidos dentro del campo del cultivo de tejidos vegetales; si bien, hay que tomar en cuenta que la planta sólo es libre de enfermedades cuando se ha comprobado su estado sanitario (24, 25, 73, 74, 95).

La siembra del material biológico se llevó a cabo en condiciones asépticas dentro de una campana de flujo laminar que previamente fue desinfectada con etanol al 70 % v/v.

El ápice meristemático se extrajo con ayuda de un microscopio estereoscópico. Se removieron cuidadosamente las escamas y primordios foliares hasta dejar el meristemo de 0.3 a 0.7 mm, mismo que se colocó en el medio de cultivo. También se sembraron yemas axilares de 1 a 3 mm, las cuales estaban cubiertas con dos o tres escamas.

Debido a la alta producción de compuestos fenólicos y oxidación del tejido que se presentaba inmediatamente después de su siembra, las yemas fueron transferidas a medio fresco 2 ó 3 días después de su siembra como sugieren algunos autores (100), sin embargo esta metodología no dio los

resultados esperados. La refrigeración del material (7° C) inmediatamente después de su siembra alrededor de 7 días y posteriormente colocándolo en oscuridad, durante una semana, antes de ponerlo en condiciones de incubación redujo notablemente la oxidación del tejido evitando de esta manera la inhibición o el retraso en el desarrollo de los brotes por la liberación de fenoles en el medio (72; 100).

Durante la fase de establecimiento, como ya se mencionó, se probaron diferentes combinaciones de BA/IBA, así como diferentes medios de cultivo (tipo de sales y consistencia del medio), realizando siembras variables en el número de explantes para cada variedad, de acuerdo con el material disponible.

6. INDUCCION A LA PROLIFERACION

Para la evaluación del efecto de diferentes medios y su consistencia, de la variedad agronómica y de diferentes intensidades luminosas, se realizaron siembras de 15 tubos por medio, consistencia y variedad con tres repeticiones, tomando una muestra aleatoria de 5 tubos por repetición para evaluar las variables que se indican en el punto 10.

Se sembró un brote por tubo al azar, los cuales se encontraban en condiciones homogéneas, ya que todos provenían de cultivos en el medio A-1 sólido con 0.8 mg/l de BA, sin auxinas ni geberelinas (Cuadro 3), para evitar una posible interferencia que no nos permitiera observar el efecto de los factores probados.

Los medios utilizados para inducir la formación de brotes para las variedades 'Amber' y 'Heritage' fueron el A-1, A-2 y A-3 con consistencia sólida y líquida, y para las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem' el MS-1, MS-2 y MS-3 con consistencia sólida y líquida (Cuadros 2 y 3). Una vez determinado el medio de cultivo (tipo de sales y consistencia) más adecuado para cada variedad, se procedió a realizar las pruebas del efecto de diferentes intensidades luminosas en el cultivo.

7. CONDICIONES DE CULTIVO

Durante la fase de establecimiento, después del pretratamiento a 7° C y oscuridad, los tubos fueron llevados a una sala de incubación con luz blanca fría fluorescente con

una intensidad luminosa de 972 lux (2 lámparas Solar 75/T38/A1/BF Slimline de 75 watts) y se mantuvo un fotoperiodo constante de 16 horas de luz por 8 de oscuridad a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$. Estas mismas condiciones se mantuvieron en la etapa de proliferación, además de que se probaron dos intensidades luminosas más para evaluar su influencia en esta etapa, denominándolas: Baja (972 lux); Media (1296 lux) y Alta (1620 lux), que corresponden a 2, 4 y 6 lámparas respectivamente, con las especificaciones ya mencionadas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Condiciones de cultivo evaluadas durante la etapa de proliferación.

Intensidad Probada	Fotoperiodo		Temperatura
	Horas luz	Horas oscuridad	
Baja (972 lux)	16	8	$25 \pm 2^{\circ} \text{C}$
Media (1296 lux)	16	8	$25 \pm 2^{\circ} \text{C}$
Alta (1620 lux)	16	8	$25 \pm 2^{\circ} \text{C}$

B. ENRAIZAMIENTO

Para determinar la influencia de la longitud del brote y del grosor de la base del mismo, en la inducción del sistema radical así como en el número, longitud y biomasa de las raíces producidas, se pusieron a enraizar brotes de cada variedad, separándolos en tres clases de acuerdo a su longitud, de la siguiente manera:

- Clase I Menor de 3.0 cm
- Clase II De 3.1 a 6.0 cm
- Clase III Mayor de 6.0 cm

y de acuerdo al grosor de la base :

Clase 1	Menor de 0.84 mm
Clase 2	De 0.85 a 1.13 mm
Clase 3	Mayor de 1.13 mm

Al realizar el trasplante, los tubos se destaparon y extrajeron los brotes, los cuales se lavaron cuidadosamente con agua destilada (48) y posteriormente se sumergieron durante 15 minutos en una solución de fungicida y fertilizante [1 g/l de "lecto-60"* y 75 mg/l de "Gro-Green"*]. Al trasplantar cada brote se le aplicó en la base enraizador comercial "Radix F-1500"* (78). Se colocaron en almácigos de 43 X 25 cm y 12 cm de altura (Figura 3), que contenían agrolita estéril, bajo condiciones de alta humedad relativa, cubriéndolos con polietileno transparente para evitar la deshidratación de los brotes, que provocaría un cambio brusco de la alta humedad en que se encontraban in vitro a la baja humedad relativa ambiental (3, 17, 18, 29, 44).

La agrolita (material volcánico natural) se eligió como sustrato debido a sus excelentes propiedades de retención de humedad, que es de tres a cuatro veces su peso (su capacidad de absorción es de 251.60 g agua/100g), a la vez que se logra una buena aereación (94.75 % de espacio poroso total y 78.18 % v de aire) y por su capacidad amortiguadora (2.47 % v) (3, 45, 98).

Los brotes se asperjaron una o dos veces por semana con la solución de fungicida-fertilizante en la concentración antes mencionada.

Se consideró una muestra aleatoria de 20 plántulas con dos repeticiones para la toma de datos de las variables peso, longitud y número de raíces, y toda la población para el porcentaje de brotes enraizados.

9. ADAPTACION DE LAS PLANTULAS OBTENIDAS IN VITRO A CONDICIONES AMBIENTALES

Las plántulas enraizadas se trasplantaron a macetas de plástico con capacidad de medio kilo que contenían una mezcla esterilizada de tierra negra y agrolita en una proporción de 3:1. Cada maceta fue cubierta con una bolsa de plástico transparente a la que se le fueron haciendo perforaciones a la semana del trasplante, con la finalidad de que las plantas se adaptaran a una menor humedad relativa, hasta la eliminación total de la bolsa (46) (Figura 4). También se trasplantaron directamente a esta mezcla de tierra negra: agrolita brotes enraizados espontáneamente in vitro.

* Ver Apéndice A

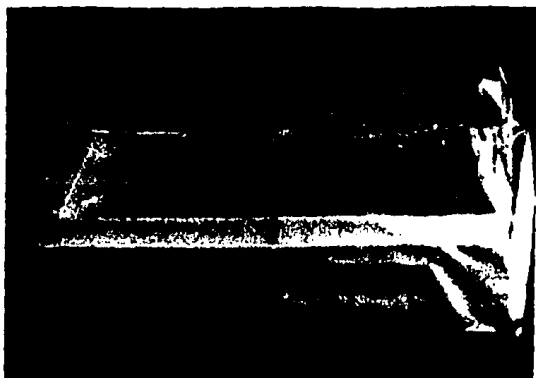


Figura 3. Brotes obtenidos in vitro, en agrolita estéril bajo condiciones de alta humedad relativa durante la inducción de sistema radical.



Figura 4. Plántula en proceso de adaptación a condiciones ambientales.

10. REGISTRO DE DATOS

Se evaluaron los siguientes parámetros para cada etapa:

Desinfestación

- Porcentaje de contaminación (número de tubos contaminados por hongos y/o bacterias)
- Porcentaje de ápices oxidados (muertos)

Establecimiento a condiciones in vitro

- Porcentaje de respuesta (desarrollo de hojas y tallos)
- Longitud de los brotes
- Número de hojas y coloración
- Formación de tejido calloso, textura y coloración
- Cualquier otra respuesta significativa

Proliferación de brotes

- Número de brotes generados por tubo
- Número de hojas (por tubo y por brote)
- Longitud de los brotes
- Biomasa producida (peso)
- Formación de tejido calloso, textura y coloración
- Cualquier otra respuesta significativa

Enraizamiento

- Porcentaje de brotes enraizados
- Número de raíces por brote
- Longitud de las raíces
- Biomasa producida (peso de las raíces)

11. ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) utilizando diseños factoriales con dos y tres criterios de clasificación, según el caso, con arreglo experimental completamente aleatorio considerando como unidad experimental cada tubo de ensayo. Para establecer diferencias entre pares de medias, cuando éstas se presentaron, se utilizó la prueba de Duncan (23, 65).

Los resultados que se consideraron en porcentajes fueron sometidos a una prueba de hipótesis con dos criterios de clasificación en las tablas de contingencia y a pruebas de contraste de hipótesis para establecer diferencias (65).

RESULTADOS Y DISCUSION

1. DESINFESTACION

Uno de los problemas más serios encontrados en el cultivo de tejidos vegetales, es la contaminación de los cultivos, ya que ésta afecta finalmente y de una manera determinante el éxito en la propagación *in vitro* (21). De ahí la importancia de establecer una metodología eficaz de desinfestación para las variedades de frambuesa y zarzamora estudiadas.

En la variedad 'Amber' se presentaron diferencias en los porcentajes de contaminación (valor calculado: 6.08; valor teórico: 4.460; $P < 0.05$) y oxidación (necrosamiento del tejido y producción de fenoles) (valor calculado: 4.350; valor teórico: 3.110; $P < 0.05$) para cada agente desinfestante y tiempo de contacto probado; se observó una relación inversamente proporcional entre estos porcentajes, lo cual es lógico, ya que un mayor tiempo de acción ocasiona la muerte de los patógenos, pero a su vez daña el tejido (120) (Figura 5).

Asimismo, al realizar la prueba estadística de independencia entre los factores tiempo de exposición y tipo de agente desinfestante en los porcentajes de contaminación y oxidación de la variedad 'Amber' de frambuesa, se obtuvieron los siguientes valores calculados respectivamente: 27.250 y 149.127 contra un valor teórico de 15.507 ($P < 0.05$).

Lo anterior mostró que los factores no actúan de manera independiente, por lo que se presentaron diferencias entre cada agente desinfestante y tiempo de acción, hecho que resalta la importancia del tipo de agente empleado con un tiempo de exposición determinado, es así que no sólo con un mayor tiempo de contacto se obtiene menor contaminación.

Si bien, se presentan bajos porcentajes de contaminación con los tres agentes desinfestantes en los tiempos de exposición de 30 y 45 minutos (de 0.0 a 14.3 %) resultan a la vez valores altos en los porcentajes de oxidación con el peróxido de hidrógeno y el nitrato de plata (29.2 y 51.2 % a los 30 minutos y 45.4 y 60.6 % a los 45 minutos, respectivamente) por lo que se determinó que la metodología de desinfestación más eficaz era utilizar el hipoclorito de sodio al 1.2 % (20 % v/v de una solución comercial) durante 30 minutos (al obtener 0.0 % de contaminación y 25.0 % de oxidación), ya que un menor tiempo de contacto ocasionó problemas de contaminación considerables y la exposición del tejido al agente desinfestante durante

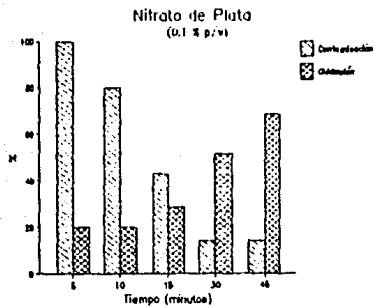
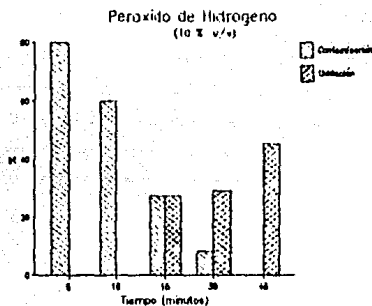
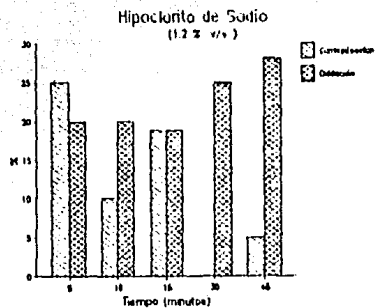


Figura 5. Porcentajes de contaminación y oxidación obtenidos en la variedad 'Amber' de frambuesa, con los tres agentes desinfectantes.

mayor tiempo causó su oxidación y la producción de fenoles, que llegó a provocar el necrosamiento y muerte del tejido.

Estos resultados se vieron corroborados posteriormente al realizar las pruebas de desinfección con el hipoclorito de sodio para las otras variedades (Figura 6), generalizando de esta manera el procedimiento de desinfección a seguir en las variedades 'Amber' y 'Heritage' de frambuesa y las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem' de zarzamora provenientes del campo; dado que se lograron establecer con éxito los ápices y yemas vegetativas a condiciones in vitro, al desinfectarlos con hipoclorito de sodio al 1.2 % v/v durante 30 minutos, y se superó así el problema de contaminación (21).

Algunos autores han reportado este procedimiento de desinfección en otras variedades provenientes del campo (9, 22); sin embargo, debido al daño que este método provoca se tuvo que implementar un tratamiento con antioxidantes para disminuir este efecto deletéreo. El más efectivo fue el de aplicar al final de la secuencia de desinfección una solución estéril de L-cisteína al tejido (en la que se mantuvieron los ápices y yemas hasta el momento de su siembra) y posteriormente, someter a refrigeración y a oscuridad el material vegetativo, antes de ponerlo en las condiciones de cultivo (16 horas de luz -972 lux- por 8 horas de oscuridad y a una temperatura de 25 ± 2°C). Con base en los datos obtenidos el no aplicar este procedimiento antioxidante al final de la desinfección, y el no mantener las condiciones de baja temperatura y oscuridad antes de colocar los cultivos bajo condiciones de luz, conducía a la pérdida total del tejido.

El control de la oxidación del tejido es un aspecto de suma importancia dado que se ha demostrado que el oscurecimiento de los tejidos causa la inhibición del crecimiento, y usualmente el tejido llega a morir; asimismo, la toxicidad de los fenoles producidos por el tejido se traduce en una inhibición irreparable del crecimiento (38).

La condición de oscuridad o iluminación difusa previene la acumulación de productos de la oxidación fenólica y por tanto provoca una subsecuente disminución en la tasa de crecimiento (5).

No obstante que en la figura 7 se observan valores altos de contaminación para la variedad 'Smoothstem', éstos se abatieron al sembrar inóculos más pequeños (ápices meristemáticos de 0.3 a 0.7 mm con uno o dos primordios foliares) a porcentajes menores al 10 %, hecho que está relacionado con el tamaño del inóculo y el número de escamas que cubren el ápice vegetativo (8, 27); y aunque la tasa de supervivencia decrece, la tasa de crecimiento de los que sobreviven se incrementa y disminuye también el porcentaje de contaminación (28).

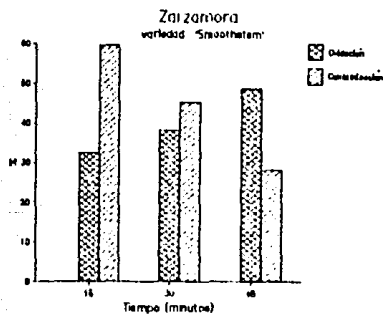
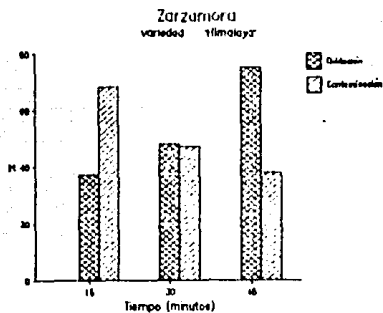
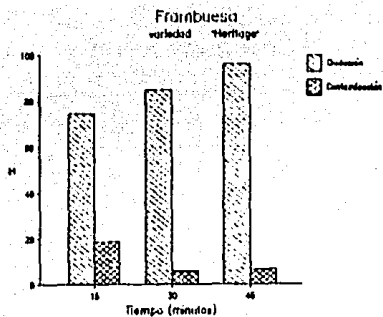


Figura 6. Porcentajes de contaminación y oxidación obtenidos en la variedad 'Heritage' de frambuesa e 'Himalaya' y 'Smoothstem' de zarzamora, con el hipoclorito de sodio al 1.2% v/v.

2. ESTABLECIMIENTO A CONDICIONES IN VITRO

El establecimiento y crecimiento de los tejidos vegetales in vitro, generalmente está determinado por la naturaleza del explante y la composición del medio nutritivo, e incluso por la forma física del medio, la cual afecta la tasa de crecimiento y el patrón de morfogénesis que sigue el tejido (82).

El estado de la planta donadora influye en la tasa de supervivencia del explante primario y su potencia organogénica (94), esto es, en la secuencia de desarrollo, que termina con la formación de órganos diferenciados o aun en la formación de plantas completas (47). Los reguladores del crecimiento vegetal juegan un papel fundamental en la actividad fisiológica de las plantas, ya que está mediada por estos (11, 14, 26) y más específicamente por el balance hormonal entre citocininas y auxinas (41). Por lo anterior se consideró necesario determinar las concentraciones óptimas de los reguladores del crecimiento, para el establecimiento de cada cultivar.

En el cuadro 5 se presentan los resultados de establecimiento obtenidos para cada una de las variedades en las diferentes concentraciones hormonales de prueba, tanto de BA (0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mg/l) como de IBA (0.1 mg/l). Cuando se eliminó el IBA la respuesta fue muy pobre; esto mismo ocurrió cuando fue incrementada su concentración a 1.0 mg/l, provocando además mayor proliferación de tejido calloso, (14, 26) principalmente en el caso de la zarzamora.

Como se señala en el cuadro 5, los valores que se presentan para la frambuesa se obtuvieron al utilizar el medio A-3, es el medio nutritivo recomendado por Anderson (1978, cit. 92) para el cultivo de Rubodendron y que ha sido utilizado para el cultivo de frambuesa (92); mientras que para las variedades de zarzamora se utilizaron las sales basales de Murashige y Skoog, ya que el medio A-3 provocó clorosis en los tejidos, posiblemente debido a deficiencias minerales, ya que el medio A-3 es un medio pobre en nutrientes.

El efecto de fitotoxicidad producido por el medio MS en la frambuesa durante las pruebas preliminares, manifestado por clorosis y muerte prematura de los tejidos, ha sido descrito por otros autores (6, 8) y puede atribuirse a las altas concentraciones de nitratos en este medio de cultivo, ya que se ha demostrado que esto incrementa en otras rosáceas la oxidación y muerte del tejido (5).

Algunos autores (8, 92, 118) han reportado el efecto fitotóxico de altas concentraciones de BA en Rubus, e incluso han sugerido que su establecimiento in vitro debe

llevarse a cabo con ausencia de reguladores del crecimiento; otros no han encontrado efectos significativos aun con 5.0 mg/l de de BA (109).

Los resultados de pruebas preliminares en las variedades estudiadas de frambuesa mostraron que concentraciones mayores a 2.5 mg/l de BA, ocasionaban daño al tejido, razón por la cual no se probaron concentraciones mayores a 2.0 mg/l de BA, como se indica en el cuadro 5.

Al comparar los porcentajes de Apices establecidos de frambuesa en cada uno de los tratamientos hormonales probados, éstos resultaron ser estadísticamente diferentes (valor calculado: 11.683; valor teórico: 9.000; $P < 0.05$) por lo que la organogénesis y morfogénesis del tejido inicial depende de la concentración de citocinina en el medio de cultivo. Asimismo, se observó que entre las variedades 'Amber' y 'Heritage' la respuesta del inóculo no fue la misma a concentraciones mayores y menores de 1.0 mg/l de BA; esto es, la respuesta de la variedad agronómica depende de la concentración de BA con base en los valores obtenidos en la tablas de contingencia (calculado: 20.112; teórico: 5.991; $P < 0.05$).

En el caso de la zarzamora, también resultó ser significativamente diferente la respuesta de los ápices vegetativos en cada tratamiento hormonal (valor calculado: 23.250; valor teórico: 5.050; $P < 0.05$) pero no hubo diferencias entre las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem' de acuerdo a los valores de ji-cuadrada obtenidos al realizar las tablas de contingencia para la zarzamora (calculado: 3.863; teórico: 11.070; $P < 0.05$).

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Broome y Zimmerman (1978), Donnelly *et. al.* (1980) y James *et. al.* (1980), quienes señalan que la concentración óptima para el establecimiento de cultivares de frambuesa y zarzamora es la adición de 1.0 mg/l de BA y 0.1 mg/l de IBA al medio de cultivo.

Al probar concentraciones intermedias de BA (0.0, 0.4, 0.7, 1.0 y 2.5 mg/l) en la variedad 'Amber' de frambuesa, así como concentraciones de 0.5 mg/l de BA en la variedad 'Smoothstem' de zarzamora, no se presentaron resultados diferentes a los ya obtenidos, es decir, el porcentaje de brotes con respuesta (crecimiento y formación de hojas) siempre fue considerablemente mayor en la concentración hormonal ya determinada (1.0 mg/l de BA/0.1 mg/l de IBA).

Los resultados que se presentan en el cuadro 5 se obtuvieron en medios de cultivo sólidos. La variedad 'Himalaya' de zarzamora únicamente fue evaluada en estas condiciones debido a la restricción de material vegetativo; en contraste, las variedades 'Amber' de frambuesa y 'Smoothstem' de zarzamora presentaron mejor respuesta en esta

Cuadro 5. Porcentaje de ápices establecidos con respuesta (crecimiento y formación de hojas)

Tratamiento* [IBA mg/l]	Frambuesa		Zarzamora	
	'Amber'	'Heritage'	'Himalaya'	'Smoothstem'
0.0	0.0	7.55	0.0	0.0
1.0	70.15	65.62	46.66	65.87
2.0	42.85	13.27	33.33	47.61
3.0	--	--	13.41	36.05
4.0	--	--	18.91	36.31
5.0	--	--	12.37	23.33

* Utilizando el medio A-3 para las variedades de frambuesa y el MS-1 para las variedades de zarzamora, con consistencia sólida y manteniendo en ambos casos la concentración de 0.1 mg/l de IBA.

consistencia respecto a los medios líquidos, tomando en consideración la baja proporción de ápices establecidos y el alto índice de mortandad observado en pruebas preliminares con medios de cultivo con consistencia líquida.

La variedad 'Heritage' de frambuesa respondió en forma excelente cuando se sembraron brotes apicales en medio de cultivo líquido (medio A-3 con 1.0 mg/l de BA y 0.1 mg/l de IBA) en agitación constante, en comparación con los ápices meristemáticos en los medios de cultivo sólidos; se obtuvo una alta proliferación (más de 50 brotes por inóculo en 6 semanas). Sin embargo, estos resultados no son significativos dado el restringido número de unidades experimentales con que se llevó a cabo; no obstante puede considerarse como una opción para el establecimiento de este cultivar.

Los ápices que presentaron respuesta fueron evaluados en su crecimiento y formación de hojas a los 48 días de su cultivo.

El número de hojas de los de los brotes formados de cada especie no mostró diferencias significativas debido a la variedad agronómica; para la frambuesa el valor calculado fue 0.683 y el teórico 4.052 y para la zarzamora se obtuvo un valor calculado de 0.709 y un teórico de 4.210 ($P < 0.05$). Al observar los valores promedio del número de hojas para cada especie (Tabla 2) se demuestra que la inducción de hojas es diferente para cada especie.

Los ápices de frambuesa produjeron brotes con forma arrosada, mismos que presentaron el mayor número promedio de hojas (10.04 y 8.81 para la variedad 'Amber' y 'Heritage' respectivamente), aunque de pequeñas dimensiones.

Las variedades de zarzamora presentaron menores valores promedio de número de hojas inducidas (4.30 y 5.00 para la variedad 'Himalaya' y 'Smoothstem' respectivamente) en comparación con la frambuesa.

El haber cuantificado un mayor número promedio de hojas producidas en la frambuesa, respecto a la zarzamora, se debió a que las variedades de frambuesa respondieron más rápidamente (en 2 - 3 semanas) después de la siembra inicial para el establecimiento de los cultivos in vitro, mientras que en las variedades de zarzamora la respuesta se manifestó después de 4 semanas, lo cual coincide con lo reportado por otros autores (9, 109, 118).

La longitud de los brotes resultó ser significativamente diferente entre las variedades de frambuesa (valor calculado: 11.604; valor teórico: 4.052; $P < 0.05$) pero no hubo diferencias estadísticas entre las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem' de zarzamora (valor calculado: 2.378; valor teórico: 4.210; $P < 0.05$). Se

Tabla 2. Comparación de las medias de la variable número de hojas, durante el establecimiento in vitro.

Frambuesa		Zarzamora	
'Amber'	'Heritage'	'Himalaya'	'Smoothstem'
10.045	8.815	4.308	5.000

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (P < 0.05)

Tabla 3. Comparación de las medias de la variable longitud de los brotes (cm), durante el establecimiento in vitro.

Frambuesa		Zarzamora	
'Amber'	'Heritage'	'Himalaya'	'Smoothstem'
0.9364	0.6481	0.5615	0.9000
a*	b		

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (P < 0.05).

(Datos obtenidos 48 días después de la siembra inicial)

obtuvieron las mayores longitudes promedio de los brotes en las variedades 'Amber' de frambuesa y 'Smoothstem' de zarzamora (0.94 y 0.8 cm, respectivamente) (Tabla 3).

Por otra parte, cuando se sembraron yemas vegetativas (ápice meristemático con 4 o 5 escamas) de zarzamora, hubo una tendencia a la formación de callo; sin embargo, a partir de éste se desarrollaron brotes, lo cual ya ha sido observado por otros autores (19) (figuras 7 y 8) y si bien el desarrollo directo de brotes a partir del explante primario sin crecimiento intermedio de callo es preferible (94), el hecho de tener facilidad en la dediferenciación del tejido calloso en brotes incrementa la potencialidad de propagación a mayor escala de esta especie, aunque cabría esperar el comportamiento en campo de estas plantas, ya que en algunos casos los brotes formados a partir de callo tuvieron peciolos aplanados (figura 9), lo que indica que es probable que haya ocurrido alguna alteración genética, lo cual se encuentra con frecuencia en los cultivos de callo (37).

De manera cualitativa, la variedad 'Himalaya' presentó una mayor tendencia a la formación de callo y menor producción de brotes a partir de éste, en comparación con la variedad 'Smoothstem' en la etapa inicial.

Las yemas vegetativas de ambas variedades de frambuesa, originaron de manera directa brotes; aunque es de resaltar el hecho de obtener formación de brotes en la base de las escamas de la variedad 'Heritage'. Las frambuesas y en general el género Rubus, suelen tener una yema accesoria (8), pero en nuestro caso sólo sembramos la yema principal. Al revisar cuidadosamente escamas (sin sembrar) de frambuesa, observamos un pequeño meristemoide en la base, sin embargo, como se observa en las figuras 10 y 11, se obtuvieron múltiples brotes (2 a 7), semejante a un proceso de embriogénesis somática (24, 76). No obstante que este punto queda aún por dilucidar más claramente, podemos considerar además del ápice del brote a las escamas que lo cubren como otra ruta alternativa para su propagación in vitro.



Figura 7. Brote de zarzamora 'Smoothstem' obtenido a partir de tejido calloso. Obsérvese la yema vegetativa en la parte central.



Figura 8. Brote de la variedad 'Himalaya' de zarzamora, con gran cantidad de callo en la base a partir del cual se originó.



Figura 9. Brotes de zarzamora 'Smoothstem'
con peciolo aplanados.



Figura 10. Pequeños brotes formados en la base de las escamas en yemas vegetativas de la variedad 'Heritage' de frambuesa.



Figura 11. Brotes formados en la base de las escamas de yemas vegetativas de la variedad 'Heritage' de frambuesa.

3. PROLIFERACION DE BROTES

No obstante que el balance hormonal es considerado como el factor dominante en la formación y desarrollo de brotes, los efectos sinérgicos de las hormonas pueden ser modificados por otros factores, como son los constituyentes del medio (el crecimiento y la diferenciación pueden estar controlados por los diversos componentes del medio entre los cuales la solución mineral juega un papel importante) y las condiciones físicas (iluminación, consistencia del medio, etc.) (10, 82); lo anterior se observó durante la etapa de proliferación, en la que al probar medios con diferencias en la cantidad y calidad de sales y diferente consistencia, pero con la misma cantidad de reguladores del crecimiento se manifestaron diferencias en el número de brotes y hojas, en la longitud de los brotes y consecuentemente en la biomasa producida (peso).

Según Lane y McDougald (1982, cit. 8) es posible que las diferencias observadas se deban a los niveles hormonales endógenos, o bien a las diferencias en el grado de absorción y transporte de dichas sustancias, además de la influencia que podría tener el genotipo de cada variedad (37).

Los resultados que a continuación se presentan se obtuvieron a los 60 días después del trasplante de los brotes a los medios de proliferación.

3.1. Frambuesa

3.1.1. Número de brotes

Se presentaron diferencias significativas entre las dos variedades de frambuesa respecto al número de brotes producidos, debidas al medio de cultivo y a su consistencia (Tabla 4 y Tabla T.1 del Anexo 1); en las dos variedades se obtuvo el mayor número de brotes en las sales de Anderson (A-1), aunque para la variedad 'Amber' la proliferación fue mayor en el medio líquido (promedio de 9.73 brotes), mientras que para la variedad 'Heritage' fue en el medio con consistencia sólida (10.20 brotes) (Tabla 5); los resultados de proliferación obtenidos en nuestros experimentos son aproximadamente el doble de los reportados por otros autores que han obtenido de 3 a 5 brotes por inóculo aproximadamente en el mismo tiempo de cultivo (6, 8, 89, 106, 115).

Tabla 4. Significancia de los factores de variación para las variables evaluadas, en la proliferación de la frambuesa.

	V A R I A B L E			
	Número de brotes	Número de hojas	Longitud de brotes	Peso fresco
Factor 1 (Consistencia)	S	S	S	S
Factor 2 (Medio de cultivo)	S	S	S	NS
Factor 3 (Variedad)	S	S	S	NS
Inter. 1X2	NS	NS	S	S
Inter. 1X3	S	S	NS	NS
Inter. 2X3	NS	NS	NS	NS
Inter. 1X2X3	S	S	NS	NS

Significativo (S); No Significativo (NS).

Tabla 5. Comparación de las medias de la variable número de brotes para las dos variedades de frambuesa, en respuesta al medio de cultivo y su consistencia durante la etapa de proliferación.

Medio	A-1		A-2		A-3	
	S.	L.	S.	L.	S.	L.
Variedad						
'Amber'	7.133 b*	9.733 a	5.933 bc	3.400 cd	4.267 cd	4.533 bcd
'Heritage'	10.200 a	2.600 d	4.600 cd	3.467 cd	5.067 bcd	2.733 d

Consistencia sólida (S.); Consistencia líquida (L.)

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (P < α = 0,05).

Tabla 6. Comparación de las medias de la variable número de hojas para las dos variedades de frambuesa, en respuesta al medio de cultivo y su consistencia, durante la etapa de proliferación.

Medio	A-1		A-2		A-3	
	S.	L.	S.	L.	S.	L.
Variedad						
'Amber'	37.600 bc*	47.533 ab	40.400 abc	15.067 d	25.867 cd	16.533 d
'Heritage'	53.467 a	13.133 d	25.267 cd	10.600 d	23.933 d	9.067 d

Consistencia sólida (S.); Consistencia líquida (L.)

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (P < α = 0,05).

Avitia (1985) señala que obtuvo menor número de brotes en el medio Murashige y Skoog (MS) con relación al Anderson (A), debido a que las sales del medio MS son tóxicas ya que contienen cuatro veces más nitratos que el medio A. Esto coincide con que la producción de brotes haya sido menor en el medio A-2 en comparación con el medio A-1, dado que el medio A-2 contiene el doble de la cantidad de nitratos que el medio A-1. Por otra parte, también señala que las diferencias que obtuvo en la inducción de brotes se debieron a deficiencias de hierro, por tener menor concentración de sales de hierro el medio MS (la mitad) en relación al A, por lo que con base en esto se adicionó a los medios A-2 y A-3 la misma cantidad de sales de hierro que la del medio A-1 (medio Anderson, 1980).

Al analizar el Cuadro 2 observamos que básicamente las diferencias entre los medios A-1 y A-3 son la cantidad de sulfato de magnesio, que es una cuarta parte en el medio A-3 respecto al A-1, si bien, aunque no existen otras fuentes de magnesio, sí existen otras fuentes de sulfatos. La cantidad de fosfatos tampoco es la misma, ya que el medio A-1 contiene 380 mg/l de fosfato de sodio, mientras que el medio A-3 contiene sólo 42.5 mg/l de fosfato de potasio; en vista de que el sodio no es un elemento requerido en grandes cantidades (14, 79) además de que existen otras fuentes de sodio y de potasio en el medio es posible que las diferencias en la producción de brotes entre los medios A-1 y A-3 (y A-2 con 85.0 mg/l de fosfato de potasio) se deban a deficiencias de fosfatos, dado que se obtuvo mayor cantidad de brotes en el medio A-1 con consistencia sólida para ambas variedades (Figura 12).

En todos los medios con consistencia líquida para la variedad 'Heritage' se obtuvo un menor número de brotes con respecto a los medios con consistencia sólida, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, excepto para el medio A-1 (ver tabla 5); mientras en la variedad 'Amber' se obtuvo la mayor producción de brotes en el medio A-1 con consistencia líquida pero en los medios A-2 y A-3 sólidos y líquidos la proliferación de brotes no fue significativamente diferente (Tabla 5).

Lo anterior nos indica que la selección correcta de la consistencia del medio de cultivo es un factor determinante en el cultivo de algunas variedades, por lo que hay que tomarlo en cuenta para lograr una tasa más alta de multiplicación de brotes (28, 73).

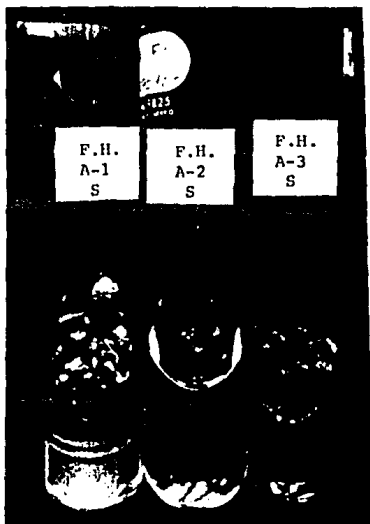


Figura 12. Efecto del medio de cultivo en la proliferación de brotes en la variedad 'Heritage'.

3.1.2. Número de hojas

La inducción de hojas varío de manera directamente proporcional al número de brotes obtenidos en cada tratamiento y para cada variedad. La consistencia del medio, el medio de cultivo la variedad agronómica y la interacción entre estos factores afectó significativamente la formación de hojas (Tabla 4 y Tabla 1.2 del Anexo 1).

La variedad 'Amber' presentó mayor número de hojas totales (por unidad experimental) en el medio A-1 con consistencia líquida (47.53) y la variedad 'Heritage' en el mismo medio pero con consistencia sólida (55.47); para esta variedad ninguno de los demás tratamientos con consistencia sólida o líquida presentó diferencias significativas entre sí con respecto a la producción de hojas (Tabla 6).

El número de hojas es un parámetro de suma importancia dado que en base al número de nudos por brote, los cuales contienen meristemas axilares, la proliferación de los brotes se ve aumentada en función de que se pueden realizar resiembras de segmentos de los brotes, conteniendo dos a tres yemas axilares por fracción (19, 118) duplicando o triplicando con esto la producción de brotes durante esta etapa. Por esta razón además de considerar el número de hojas (totalmente sanas), por tubo, se consideró el número de hojas por brote, obteniendo una media de 6.38 hojas por brote para la variedad 'Amber' y de 5.93 hojas para la variedad 'Heritage'.

3.1.3. Longitud de los brotes

Las diferencias que se presentaron en la longitud de los brotes se debieron a el tipo de sales o medio de cultivo y su consistencia, la interacción entre estos dos factores y la variedad (Tabla 4 y Tabla 1.3 del Anexo 1).

En la variedad 'Amber' no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los medios de cultivo A-2 y A-3 sólidos y líquidos y el medio A-1 sólido (Tabla 7), ya que hubo diferencias notables con relación a la longitud obtenida en el medio A-1 con consistencia líquida (2.43 cm) (figura 13 y Tabla 7).

Los brotes de la variedad 'Heritage' presentaron la mayor longitud promedio en el medio A-1 con consistencia líquida (2.59 cm), la cual fue estadísticamente diferente a la de los brotes en los otros tratamientos; así, se observó

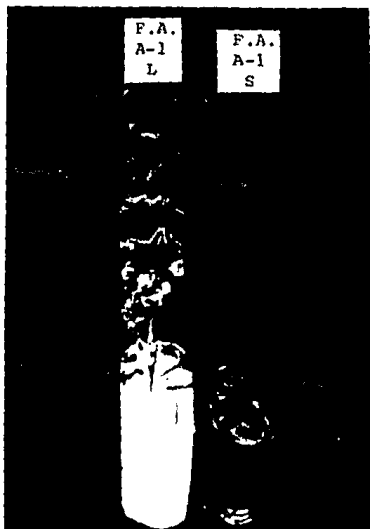


Figura 13. Variedad 'Amber' de frambuesa en el medio de cultivo A-1 con consistencia sólida y líquida.

Tabla 7. Comparación de las medias de la variable longitud de los brotes (cm) para las dos variedades de frambuesa en respuesta al medio de cultivo y su consistencia durante la etapa de proliferación.

Medio	A-1		A-2		A-3	
	S.	L.	S.	L.	S.	L.
Variedad						
'Amber'	1.800 b*	2.433 a	1.493 bc	1.527 bc	1.667 bc	1.407 bc
'Heritage'	1.413 bc	2.593 a	1.520 bc	1.167 c	1.107 c	1.280 bc

Consistencia sólida (S.); Consistencia líquida (L.)

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (P < α = 0.05).

Tabla 8. Comparación de las medias de la variable peso (g) para las dos variedades de frambuesa en respuesta al medio de cultivo y su consistencia durante la etapa de proliferación.

Medio	A-1		A-2		A-3	
	S.	L.	S.	L.	S.	L.
Variedad						
'Amber'	0.124 bc*	0.321 a	0.215 ab	0.063 c	0.225 ab	0.057 c
'Heritage'	0.146 bc	0.128 bc	0.228 ab	0.048 c	0.0203 c	0.046 c

Consistencia sólida (S.); Consistencia líquida (L.)

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (P < α = 0.05).

una respuesta inversa al número de brotes (8); y resultó no ser significativamente diferente la longitud de los brotes en los medios A-1 sólido, A-2 y A-3 sólidos y líquidos (Tabla 7).

3.1.4. Peso

La biomasa total producida se vio afectada por la consistencia del medio y la interacción consistencia - medio (Tabla 4 y Tabla T.4 del Anexo 1). Como era de esperarse, los mayores pesos se obtuvieron en los tratamientos donde la proliferación de brotes fue mayor. Para la variedad 'Amber', se obtuvo el mayor peso fresco con el medio A-1 líquido (0.32 g en promedio) y se observa claramente el efecto que tiene la interacción del medio de cultivo y la consistencia, ya que en los dos medios con consistencia líquida se obtuvieron valores menores.

En la variedad 'Heritage' a pesar de las grandes diferencias en el número de brotes como en el caso del medio A-1 sólido y líquido, no se presentaron diferencias estadísticas en la biomasa producida; esto se debió a la tendencia de producir raíces en los medios líquidos, mientras que en los medios de cultivo con consistencia sólida no tendieron a emitir raíces (que formaron parte del peso total) (Tabla 8).

Para ambas variedades en los medios con consistencia líquida se presentaron porcentajes elevados de formación de raíces in vitro, mismos que resultaron ser estadísticamente diferentes de los porcentajes obtenidos en los medios de cultivo sólidos (valor calculado: 34.400; valor teórico: 5.050; $P < 0.05$) (Figura 14). En los medios A-2 y A-3 se obtuvieron los mayores porcentajes de brotes enraizados (40 % y 50 % respectivamente) para la variedad 'Amber', lo cual tiene relación con el menor número de brotes obtenidos en estos medios (64), ya que en el medio donde se presentó mayor producción de brotes (A-1) el porcentaje de enraizamiento fue menor (30 %); lo mismo ocurrió con la variedad 'Heritage', que presentó el mayor porcentaje de enraizamiento (70 %) en el tratamiento en el que se obtuvo la menor proliferación de brotes, la cual ocurrió en el medio A-1 líquido. En los medios A-2 y A-3 se presentaron porcentajes de 20 % y 30 % respectivamente.

La formación de raíces in vitro para las variedades de frambuesa depende del medio de cultivo y su consistencia con base en los valores obtenidos al realizar las tablas de contingencia (calculado: 14.419; teórico: 5.991; $P < 0.05$). Esto lo podemos observar gráficamente en la figura 14, donde

se observa que el tipo de sales y la consistencia del medio de cultivo actúan de manera conjunta, dependiendo no sólo de un factor la inducción de raíces in vitro.

Podemos considerar que se presentan diferencias estadísticas entre ambas variedades, ya que se obtuvieron los siguientes valores para los factores medio de cultivo y variedad al analizar los porcentajes de enraizamiento por separado en los medios líquidos (valor calculado: 27.666) y sólidos (valor calculado: 12.487) y un valor teórico de 5.991. En vista de que los valores calculados resultaron mayores que el valor teórico, podemos concluir que para medio de cultivo con consistencia sólida y líquida, la formación del sistema radical en los brotes de frambuesa está en función de la variedad y tipo de sales.

Para los brotes con consistencia sólida el mayor porcentaje de enraizamiento en el medio A-1 con la variedad 'Amber' y para los brotes en medios con consistencia líquida en el medio A-1 con la variedad 'Heritage' se obtuvo el mayor porcentaje de enraizamiento in vitro (70 %).

De lo anterior se infiere que en la iniciación de los primordios radicales (en frambuesa y zarzamora) la presencia de auxinas exógenas no es necesaria con base en los resultados obtenidos, y en que se ha observado formación de raíces sin tratamientos hormonales (28, 101, 118).

En la variedad 'Amber' se observó excepcionalmente en algunas de las raíces producidas in vitro la formación de pequeños brotes adventicios (figuras 15 y 16), debido a que el proceso natural de reproducción del género Rubus es por rizomas y por lo tanto puede llevarse a cabo en condiciones de cultivo in vitro (algunos autores han señalado la capacidad intrínseca de especies de este género para su reproducción in vitro, 9); y resulta ser un aspecto interesante a considerar para realizar otro tipo de estudios.

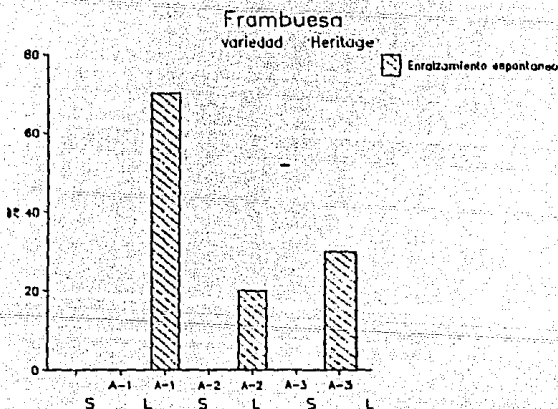
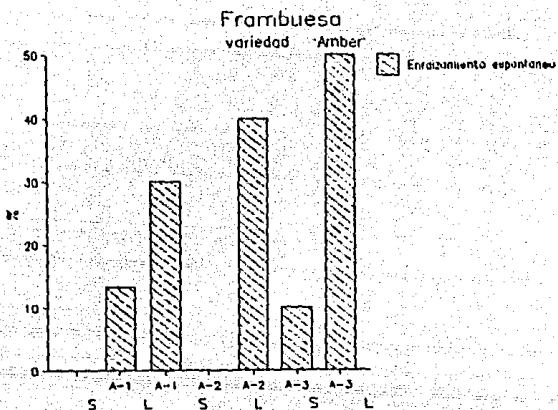


Figura 14. Porcentaje de enraizamiento espontáneo en los brotes de frambuesa, durante la etapa de proliferación.



Figura 15. Brotos adventicios en raíces formadas in vitro en la variedad 'Amber' de frambuesa.

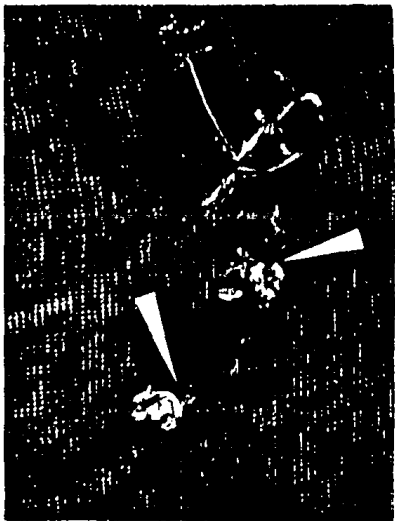


Figura 16. Brotes adventicios en raíces formadas in vitro en la variedad 'Amber' de frambuesa.

3.2 Zarzamora

3.2.1. Número de brotes

Se presentaron diferencias significativas en el número de brotes obtenidos in vitro, las fuentes de esta variación fueron la consistencia, el medio de cultivo, la interacción entre estas dos variables y la variedad agronómica (Tabla 9 y Tabla T.5 del Anexo 1).

En la Tabla 10 se presentan las medias del número de brotes producidos durante la etapa de proliferación para cada tratamiento (medio de cultivo y consistencia). Como se observa, la variedad espinosa 'Himalaya' (con una media de 21.67 brotes) fue más prolífica que la variedad sin espinas, 'Smoothstem' (con una media de 17.63 brotes) en el mejor tratamiento; si bien esta diferencia no es significativa, es importante recalcarla dado que diversos autores han reportado éxito en la propagación de variedades sin espinas (9, 19, 28, 104, 107, 121), pero no existen reportes que señalen haber logrado la micropropagación de tipos espinosos de zarzamora, lo cual podría deberse a dos razones: a que no existe interés en propagar variedades con espinas; o bien, a que no se ha tenido éxito al intentar su cultivo in vitro. Al respecto de éste último punto Caldwell (21) cita a Skirvin y Chu (1978) y señala que "los tipos espinosos sólo producen grandes cantidades de callo, ocasionalmente brotes, pero no raíces". Carrillo y Mendoza (22) obtuvieron únicamente proliferación de tejido calloso al trabajar con la variedad 'Himalaya'.

Por otra parte, existe suficiente evidencia que sustenta el hecho de que la proporción de multiplicación de brotes y por tanto las concentraciones óptimas de reguladores y los requerimientos nutricionales, pueden variar entre cultivares; más aun, puede variar de acuerdo a las condiciones en que se desarrolla la planta donadora, la época de siembra, etc. (1, 8, 74).

Al respecto debemos considerar, principalmente, que la morfogénesis, el desarrollo y crecimiento de los tejidos u órganos cultivados in vitro, está influido por su constitución genética más que por ningún otro factor (38, 119); por lo que la falta de respuesta in vitro de las variedades espinosas, reportada por otros autores, pudiera tener una posible explicación a nivel genético.

La ausencia de espinas (excepto en mutantes que sean quimeras periclinales) está determinada por un solo gen (H) con la condición sin espinas en el estado homocigótico recesivo. Asimismo, las plántulas espinosas poseen glándulas

a lo largo del margen de los cotiledones, mientras que las plántulas sin espinas tienen cotiledones lisos con ausencia total de glándulas en las cañas (69, 81, 86, 103). El gen S determina la ausencia o presencia de glándulas, y frecuentemente está ligado a un gen semiletal designado Ws, mientras que el gen H está frecuentemente ligado al gen Wh, también semiletal; éstos a su vez forman parte de un sistema letal balanceado, responsable del polimorfismo en Rubus (51, 52) y conectado a un grupo de genes recesivos deletéreos (52). Esto tiene efectos en la supervivencia y capacidad reproductiva de las plantas (51, 52).

Los genes semiletales permiten la sobrevivencia de cierta proporción de genotipos heterocigóticos afectados, es decir, el gen letal tiene un efecto diferido y en determinada combinación este gen mata al poseedor en diversas etapas de su desarrollo o hasta la edad adulta de éste. Además, la letalidad puede hallarse en muchos casos influida por el ambiente, lo que hace que el organismo sea viable (39, 59, 111).

Por otra parte, los genes que gobiernan la manera en la que los tejidos u órganos crecen o exhiben morfogénesis in vitro, obviamente no fueron involucrados para este propósito, ya que su influencia en cultivo de tejidos es solo un efecto secundario de su función normal (pleiotropía) (38).

Por lo tanto, con base en las consideraciones anteriores, es posible que hayamos tenido éxito en la propagación in vitro del cultivar espinoso 'Himalaya' debido a su constitución genética, ya que probablemente no estén presentes los genes semiletales asociados a los genes H y S y a que su genotipo sea diferente al de las variedades estudiadas por otros autores; o bien, dado que el medio y el ambiente de cultivo juegan un papel muy importante en los procesos de morfogénesis, organogénesis y expresión génica (38, 119), a que hayamos proporcionado al tejido las condiciones adecuadas que permitieron su crecimiento, desarrollo y proliferación in vitro.

La consistencia del medio resultó ser un factor determinante, ya que en todos los medios con consistencia sólida el número de brotes producidos fue mayor en comparación con los medios con consistencia líquida (Tabla 10) (Figuras 17 y 18). Esto quizá haya estado influido por el agar, ya que fisiológicamente no es inerte puesto que es una fuente de cantidades variables de macronutrientes, inhibidores o estimulantes del crecimiento, por lo que el patrón de morfogénesis y la tasa de crecimiento resultan afectados por la forma física del medio (64, 79).

No hubo diferencias significativas en la producción de brotes entre todos los medios líquidos (independientemente de la concentración de sales) para las dos variedades, a diferencia de los medios sólidos en donde se observa la

Tabla 9. Significancia de los factores de variación para las variables evaluadas en la proliferación de zarzamora.

	V A R I A B L E			
	Número de brotes	Número de hojas	Longitud de brotes	Peso fresco
Factor 1 (Consistencia)	S	S	S	S
Factor 2 (Medio de cultivo)	S	S	S	S
Factor 3 (Variedad)	S	S	NS	NS
Inter. 1X2	S	S	NS	S
Inter. 1X3	NS	NS	S	NS
Inter. 2X3	NS	NS	NS	NS
Inter. 1X2X3	NS	NS	S	NS

Significativo (S); No Significativo (NS).

Tabla 10. Comparación de las medias de la variable número de brotes para las dos variedades de zarzamora en respuesta al medio de cultivo y su consistencia durante la etapa de proliferación.

Medio	MS-1		MS-2		MS-3	
	S.	L.	S.	L.	S.	L.
Variedad						
'Himalaya'	21.667 a*	3.800 d	10.733 c	1.933 d	13.267 bc	3.067 d
'Smoothstem'	17.627 ab	2.467 d	8.533 c	1.867 d	6.667 d	2.133 d

Consistencia sólida (S.); Consistencia líquida (L.)
 * Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (P < 0.05).

Tabla 11. Comparación de las medias de la variable número de hojas para las dos variedades de zarzamora en respuesta al medio de cultivo y su consistencia durante la etapa de proliferación.

Medio	MS-1		MS-2		MS-3	
	S.	L.	S.	L.	S.	L.
Variedad						
'Himalaya'	103.133 a*	19.200 de	54.667 bc	10.400 e	50.667 c	11.400 e
'Smoothstem'	74.600 b	8.733 e	38.333 cd	4.000 e	24.800 de	6.667 e

Consistencia sólida (S.); Consistencia líquida (L.)
 * Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (P < 0.05).

influencia de la interacción entre el medio y su consistencia; el mayor número de brotes se obtuvo en el medio MS-1 sólido, mismo que presentó diferencias significativas con respecto a los medios MS-2 y MS-3, los cuales no presentaron diferencias estadísticas entre sí para cada consistencia, excepto en el medio MS-3 sólido donde la producción de brotes de la variedad 'Himalaya' fue significativamente mayor a la de la 'Smoothstem'.

3.2.2. Número de hojas

Se presentó una relación directamente proporcional entre el número de brotes y el número de hojas; el medio de cultivo, su consistencia, la interacción entre ambos factores y la variedad influyeron significativamente (Tablas 9 y T.6 del Anexo 1). Se observó la misma tendencia mostrada al analizar el número de brotes.

En los medios MS-1 con consistencia sólida se produjo mayor cantidad de hojas, el número promedio hojas para la variedad 'Himalaya' fue de 103.13 y de 74.60 para la variedad 'Smoothstem'. Los medios MS-2 y MS-3 sólidos no mostraron diferencias significativas entre sí; se obtuvieron medias de 54.66 y 50.66 hojas respectivamente para la variedad 'Himalaya' y medias en el número de hojas de 38.33 y 24.80 (también respectivamente) para la variedad 'Smoothstem'. Entre los medios líquidos tampoco se presentaron diferencias significativas y los valores medios oscilaron entre 19.20 y 4.00 hojas por tubo (Tabla 11).

El número de hojas promedio por brote para la variedad 'Himalaya' fue de 5.60 y de 5.10 para la variedad 'Smoothstem', incrementando al doble o el triple la proliferación de brotes obtenidos in vitro al realizar resiembras, cada dos meses, de fragmentos de brotes con uno a tres nudos, que contienen yemas axilares (19, 121).

3.2.3. Longitud de los brotes

El ANDEVA de la longitud de los brotes (Tabla 9 y Tabla T.7 del Anexo 1) señala diferencias significativas entre los brotes que crecieron en los diferentes tratamientos; así, el tamaño de los brotes fue afectado por el medio de cultivo y su consistencia y la interacción entre estos y la variedad.



Figura 17. Respuesta de la variedad 'Smoothstem' de zarcamora a los medios de cultivo con consistencia sólida y líquida.

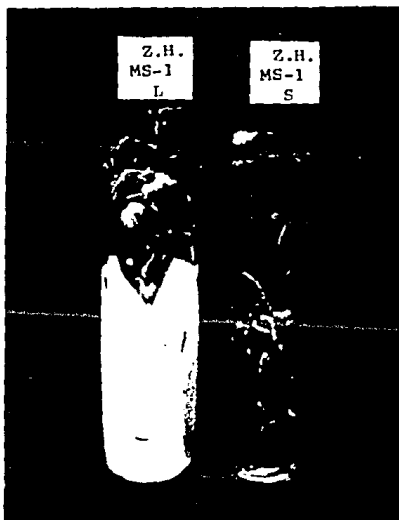


Figura 18. Respuesta de la variedad 'Himalaya' de zarcamora a la consistencia del medio de cultivo MS-1.

Tabla 12. Comparación de las medias de la variable longitud de los brotes (cm) para las dos variedades de zarzamora en respuesta al medio de cultivo y su consistencia durante la etapa de proliferación.

Medio	MS-1		MS-2		MS-3	
	S.	L.	S.	L.	S.	L.
Variedad						
'Himalaya'	2.293 b*	2.253 bc	1.773 bcd	1.593 d	1.913 bcd	1.540 d
'Smoothstem'	3.047 a	1.660 d	2.307 b	1.700 cd	1.673 d	1.560 d

Consistencia sólida (S.); Consistencia líquida (L.)

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (P < α = 0.05).

Tabla 13. Comparación de las medias de la variable peso (g) para las dos variedades de zarzamora en respuesta al medio de cultivo y su consistencia durante la etapa de proliferación.

Medio	MS-1		MS-2		MS-3	
	S.	L.	S.	L.	S.	L.
Variedad						
'Himalaya'	0.568 a*	0.115 bc	0.196 bc	0.050 c	0.255 bc	0.071 bc
'Smoothstem'	0.559 a	0.069 bc	0.279 b	0.061 c	0.162 bc	0.073 bc

Consistencia sólida (S.); Consistencia líquida (L.)

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (P < α = 0.05).

Para las dos variedades se obtuvieron brotes de mayor longitud promedio en el medio MS-1 sólido en relación a los otros medios y consistencias (Tabla 12). Se presentaron valores más altos por mayor incremento en la longitud de los brotes en la variedad 'Smoothstem' que en la variedad 'Himalaya' (medias de 3.04 cm y 2.29 cm respectivamente).

El tamaño de los brotes de la variedad 'Himalaya' no fue significativamente diferente entre los tres medios de cultivo con consistencia sólida, mientras que la longitud de los brotes de la variedad 'Smoothstem' en los medios de cultivo sólidos resultó estadísticamente diferente, por lo que se observa una respuesta diferencial entre las variedades respecto al efecto de la composición del medio de cultivo en la longitud de los brotes.

3.2.4. Peso

En relación al número de brotes (y hojas) obtenidos, el peso (biomasa producida) fue mayor en aquellos tratamientos donde se produjo mayor cantidad de brotes, con lo que se observó una relación directamente proporcional. Si bien el peso es otra variable que no ha sido considerada por otros autores, su determinación es importante, ya que en este caso corrobora los resultados anteriormente discutidos. Nuevamente la consistencia y el medio nutritivo así como su interacción son los factores que afectan significativamente la cantidad de biomasa producida (Tabla 9 y Tabla T.8 del Anexo 1). Los mayores pesos se obtuvieron en el medio MS-1, mismos que no mostraron diferencias significativas entre las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem'. Los medios líquidos no presentaron diferencias estadísticas entre sí independientemente de la concentración de las sales basales y la variedad agronómica; sin embargo, el efecto de la concentración de las sales y la interacción entre el medio y la consistencia se observa en los valores obtenidos en los medios MS-2 y MS-3 (Tabla 13).

Durante la etapa de proliferación algunos brotes presentaron formación espontánea de raíces, la cual fue estadísticamente diferente debido al medio de cultivo y su consistencia (valor calculado: 8.823; valor teórico: 5.050; $P < 0.05$). Los brotes en los medios de cultivo líquidos tuvieron una mayor formación de raíces, no inducida, que los medios sólidos; influyó también la composición del medio de cultivo al presentarse valores más altos de enraizamiento en los medios con menor concentración de sales; en los medios con mayor concentración de sales la producción de brotes se incrementó pero el enraizamiento decreció (64) (Figura 19).

Así, el enraizamiento de los brotes in vitro depende de la composición del medio y su consistencia (valor calculado: 25.293; valor teórico: 5.991; $P < 0.05$).

El medio de cultivo con consistencia sólida no favoreció la formación espontánea de sistema radical in vitro (Figura 19), hecho que se corroboró al realizar las pruebas de iluminación durante esta etapa, ya que los brotes bajo estas condiciones en medios de cultivo con consistencia sólida tampoco formaron raíces.

Asimismo, durante la etapa de proliferación en las dos variedades de zarzamora se presentó la formación de tejido calloso, apenas incipiente en algunos casos, en la base de los brotes. El porcentaje de brotes con callo en la base de cada tratamiento (Figura 19), no fue significativamente diferente (valor calculado: 0.406; valor teórico: 5.050 $P < 0.05$).

Los brotes de la variedad 'Himalaya' en el medio MS-1 sólido tuvieron el menor porcentaje de formación de callo en la base respecto a los otros tratamientos, en los que se observó un comportamiento inverso a la tendencia a la formación de raíces in vitro durante esta fase; los medios MS-2 y MS-3 sólidos presentaron los mayores porcentajes de formación de callo en la base del brote (66.6 %) y un porcentaje de 66.6 en todos los medios con consistencia líquida. Por lo que, independientemente de la composición del medio de cultivo, se observó la misma respuesta en los medios con consistencia líquida para esta variedad (valor calculado: 2.950; valor teórico: 5.991, $P < 0.05$); no obstante que, como ya se mencionó, los porcentajes de formación de tejido calloso en la base de los brotes no fue significativamente diferente.

En la variedad 'Smoothstem' no se observa una tendencia clara, ya que los factores (medio de cultivo y consistencia) son dependientes, de acuerdo a los valores obtenidos en las tablas de contingencia (calculado: 24.143; teórica: 5.991; $P < 0.05$), en función de lo cual, la formación de tejido calloso en cada tratamiento se presenta no sólo debido a la consistencia del medio sino también de acuerdo al tipo de sales.

La formación de callo en la base del brote debe considerarse, ya que esta puede implicar deficiencias en la nutrición del brote al impedir el paso de nutrientes a los tejidos vasculares, o al como afectar el enraizamiento al formar conexiones deficientes o ausencia de éstas entre el brote y las raíces que se formen a partir del tejido calloso (24). Por lo que los tratamientos que no indujeron la formación de callo en la base son más apropiados para la propagación in vitro de estos cultivares.

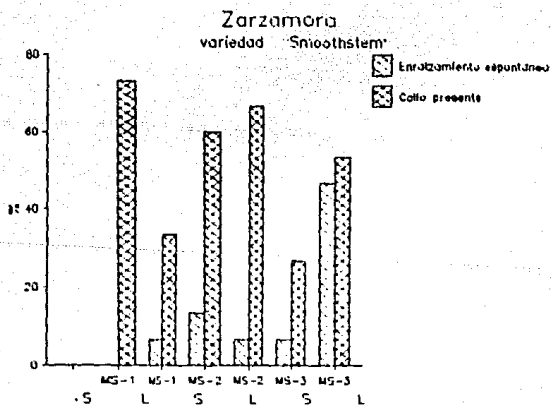
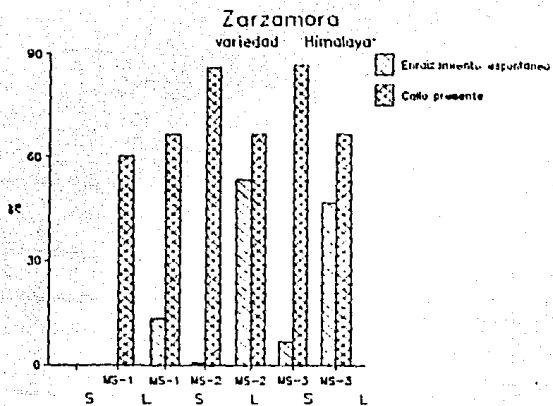


Figura 19. Porcentaje de enraizamiento espontáneo en los brotes de zarzamora, durante la etapa de proliferación.

3.3. Efecto de la intensidad luminosa

La cantidad, calidad y duración de la luz son características importantes ya que la luz desempeña una acción predominante en los procesos de fotosíntesis, fotoperiodo, fotomorfogénesis y fenómenos organogénicos (76, 116, 119). En nuestro caso, evaluamos el efecto de la cantidad de luz recibida por los cultivos durante la etapa de proliferación, utilizando tres intensidades luminosas diferentes las cuales fueron medidas en lux, ya que las fuentes eran de idéntica composición espectral (116).

3.3.1. Frambuesa

El ANDEVA mostró diferencias significativas en la proliferación de brotes e inducción de hojas entre las variedades 'Amber' y 'Heritage' debido al efecto de la intensidad luminosa en cada cultivar (Tabla 14 y Tablas T.9 y T.10 del Anexo 1).

En la variedad 'Amber' la producción de brotes y la formación de hojas fue significativamente mayor en la intensidad luminosa baja (972 lux) con respecto a las intensidades media (1296 lux) y alta (1620 lux); además de que en la intensidad luminosa baja, se apreció en los brotes y hojas un aspecto de mayor sanidad (hojas sin clorosis y sin zonas necrosadas, con color verde natural y en activo crecimiento). Esto podría estar relacionado con un ligero aumento en la temperatura de incubación en los anaqueles con intensidades luminosas más altas (de 7ª a 9ª C más), aún cuando se trató de mantener condiciones homogéneas.

La variedad 'Heritage' mostró un comportamiento diferente a la variedad 'Amber'; no se presentaron diferencias significativas en la inducción de brotes y hojas en las tres intensidades luminosas; los mayores valores promedio de número de brotes y hojas se presentaron en la intensidad media (1296 lux) (Tabla 15), lo cual podría tener relación con la tolerancia de la variedad 'Heritage' a regiones donde se reciben intensidades luminosas más altas y donde las temperaturas son más elevadas (104).

La longitud de los brotes también fue significativamente diferente entre ambas variedades debido al efecto de la intensidad luminosa (Tabla 14 y Tabla T.11 del Anexo 1), pero en este caso, las diferencias se presentaron en la variedad 'Heritage'.

Tabla 14. Significancia de los factores de variación para las variables evaluadas, en la proliferación de la frambuesa bajo tres intensidades luminosas.

	V A R I A B L E			
	Número brotes	Número hojas	Longitud de brotes	Peso fresco
Factor 1 (Intensidad luminosa)	S	S	NS	NS
Factor 2 (Variedad)	S	S	S	NS
Inter. 1X2	NS	NS	NS	S

Significativo (S); No Significativo (NS).

Tabla 15. Comparación de las medias de las variables número de brotes, número de hojas, longitud de los brotes y peso fresco de las dos variedades de frambuesa en respuesta a tres intensidades luminosas.

Variedad	Variable	Intensidad Luminosa		
		Baja	Media	Alta
'Amber'	No. Brotes	9.733 a*	3.400 b	3.400 b
	No. Hojas	47.533 a*	18.266 b	17.400 b
	Longitud (cm)	2.433 a*	2.453 a	2.173 ab
	Peso (g)	0.320 a*	0.110 c	0.099 c
'Heritage'	No. Brotes	10.200 a	11.333 a	9.066 a
	No. Hojas	53.466 a	54.866 a	43.200 a
	Longitud (cm)	1.413 b	2.066 ab	1.740 ab
	Peso (g)	0.146 c	0.304 ab	0.178 bc

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (P < 0.05)

La cantidad de luz recibida por el cultivo no afectó la longitud de los brotes de la variedad 'Amber' como se observa en la tabla 15; mientras que la longitud de los brotes de la variedad 'Heritage' se incrementó al aumentar la intensidad luminosa.

El peso fresco o biomasa producida fue estadísticamente diferente debido a la interacción del efecto de la intensidad luminosa y la variedad (Tabla 14 y Tabla T.12 del Anexo 1).

Para la variedad 'Amber' el mayor peso promedio se obtuvo en la intensidad luminosa baja (0.320 g), de manera proporcional a la proliferación de brotes y la formación de hojas (Tabla 15). Mientras que en la variedad 'Heritage' los mayores pesos promedio se presentaron en las intensidades luminosas media y alta (0.305 y 0.178 g respectivamente) en las que el tamaño de los brotes fue significativamente mayor.

3.3.2. Zarzamora

El ANDEVA de las variables número de brotes, número de hojas, y peso fresco total, durante la proliferación bajo tres intensidades luminosas para las dos variedades de zarzamora, no mostró diferencias significativas. La longitud de los brotes fue la única variable que resultó significativamente diferente entre las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem', pero para cada variedad no resultó estadísticamente diferente en las tres intensidades luminosas (Tabla 16 y 17 y Tablas T.13, T.14, T.15 y T.16 del Anexo 1).

No se observó ningún efecto en la inducción de brotes para ambas variedades, sin embargo, puede ser relevante el hecho de haber obtenido los mayores pesos promedios para las intensidades media y alta (1296 y 1620 lux respectivamente), donde el número de hojas fue menor (excepto para la intensidad media de la variedad 'Smoothstem') dado que el peso no se vio incrementado por otros factores, tales como la formación de tejido calloso o por formación de raíces in vitro, esta última fue menor al 10.0% en el medio MS-1 sólido en las tres intensidades luminosas (Tabla 17).

Se ha observado que la luz es necesaria para facilitar la expansión de la hoja en las dicotiledóneas y que la longitud máxima de la hoja por crecimiento del mesófilo tiene lugar en la luz roja en gran número de especies, dado que la proporción máxima de fotosíntesis se produce en la luz roja (116). Y aun cuando, como ya se mencionó, se utilizaron lámparas con la misma composición espectral, se ha reportado que las lámparas blancas frías fluorescentes son deficientes en radiación roja y en algunas especies pueden ser

ineficaces cuando se utilizan en intensidades bajas (116) y si bien, no se midió el área foliar, se observó un mayor tamaño de las hojas en las intensidades media y alta (Figura 20).

No obstante que se presentaron algunas diferencias o tendencias en esta especie, al no ser estadísticamente significativas, a nivel comercial, por repercusiones de tipo económico sería más redituable el utilizar la intensidad luminosa más baja, sin afectar con ésto la producción y el tamaño de los brotes obtenidos in vitro.

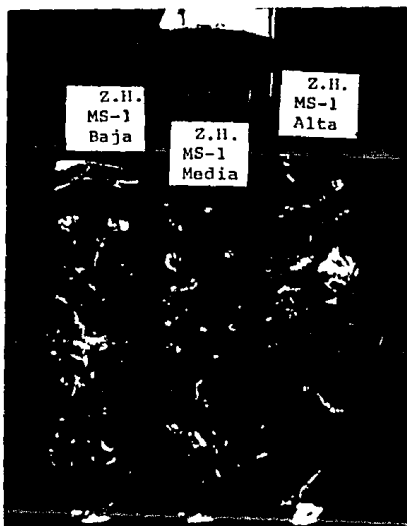


Figura 20. Efecto de la intensidad luminosa en la proliferación de la variedad 'Himalaya' de zizania. Obsérvese el tamaño de las hojas en la intensidad Alta.

Tabla 16. Significancia de los factores de variación para las variables evaluadas, en la proliferación de la zarzamora bajo tres intensidades luminosas.

	V A R I A B L E			
	Número de brotes	Número de hojas	Longitud de brotes	Peso fresco
Factor 1 (Intensidad luminosa)	NS	NS	NS	NS
Factor 2 (Variedad)	NS	NS	S	NS
Inter. 1x2	NS	NS	NS	NS

Significativo (S); No Significativo).

Tabla 17. Comparación de las medias de las variables número de brotes, número de hojas, longitud de los brotes y peso de las dos variedades de zarzamora en respuesta a tres intensidades luminosas.

Variedad	Variable	Intensidad Luminosa		
		Baja	Media	Alta
'Himalaya'	No. Brotes	21.666	19.733	18.733
	No. Hojas	103.133	77.533	82.266
	Longitud (cm)	2.293 bc*	2.100 c	2.275 bc
	Peso (g)	0.567	0.570	0.703
'Smoothstem'	No. Brotes	18.466	20.133	13.533
	No. Hojas	74.600	89.266	65.266
	Longitud (cm)	3.047 ab	3.300 a	2.775 abc
	Peso (g)	0.559	1.030	0.795

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (P < 0.05).

4. ENRAIZAMIENTO

La adaptación de los brotes transferidos de los tubos de cultivo a condiciones ex vitro algunas veces es difícil debido al pobre desarrollo del sistema fotosintético (30). No obstante, se considera que la principal causa de pérdida de material vegetativo en el trasplante es la desecación causada por la incontrolable pérdida de agua (114).

Sin embargo, el enraizamiento fuera de los tubos de ensayo representa muchas ventajas, debido a que la mayoría de las raíces que se desarrollan en medio con agar no son funcionales debido a la pérdida de los pelos radicales en el momento del trasplante (27, 89, 100), o bien a las deficientes conexiones vasculares entre la raíz y el brote.

Los porcentajes de enraizamiento obtenidos por otros autores en el género Rubus han sido muy variados en función de las variedades estudiadas, el sustrato de enraizamiento utilizado y las condiciones en las cuales se llevó a cabo la inducción del sistema radical (9, 19, 47, 89, 101, 103, 106, 118). Si bien algunos autores han obtenido mayores porcentajes de plántulas enraizadas en los sistemas in vitro, respecto a los valores que obtuvimos al enraizar los brotes en condiciones ex vitro, frecuentemente se presentan pérdidas o una baja sobrevivencia de plántulas en el momento de transferirlas a condiciones ambientales (30, 114).

Otra causa de pérdida en el material (brotes que no enraizaron) pudo deberse a la aplicación de fungicida. Maene Debergh (64) señalan que los fungicidas son tóxicos para el enraizamiento, sobre todo en plantas jóvenes y advierten que deben añadirse al sustrato después del periodo de inducción de raíces; no obstante su aplicación en algunos casos es inevitable.

4.1 Influencia de la longitud del brote

El tamaño de los brotes tuvo un efecto notable en la inducción del sistema radical. El porcentaje de enraizamiento fue considerablemente mayor en los brotes de mayor longitud (clase III) en comparación con los brotes de menor longitud (clase II y I) (Cuadro 6).

Para cada variedad de frambuesa, el porcentaje de brotes enraizados de cada clase resultó estadísticamente diferente; para la variedad 'Amber' el valor calculado fue 4.840 y para la variedad 'Heritage' fue 5.829, contra un valor teórico de 1.960 ($P < 0.05$).

Cuadro 6. Influencia de la longitud del brote en la formación del sistema radical.

Especie	Variedad	Porcentaje de enraizamiento		
		Clase I	Clase II	Clase III
F r a m b u e s a	'Amber'	23.520	57.140	---
	'Heritage'	32.584	73.333	---
Z a r z a m o r a	'Himalaya'	67.755	87.935	98.077
	'Smoothstem'	51.388	59.575	76.470

En el caso de la zarzamora, la variedad 'Himalaya' también prestó diferencias significativas en los porcentajes de enraizamiento de cada clase (valor calculado: 6.502; valor teórico: 5.991; $P < 0.05$). Aunque también fue notable el efecto de la longitud del brote, en la formación de raíces, en la variedad 'Smoothstem', los porcentajes de enraizamiento de los brotes de cada clase no resultaron estadísticamente diferentes (valor calculado: 1.736; valor teórico: 5.991; $P < 0.05$).

No se presentaron diferencias entre los brotes de cada clase de las dos variedades de zarzamora (valor calculado: 0.411; valor teórico: 5.991; $P < 0.05$).

Al observar los porcentajes de enraizamiento de cada especie y variedad tenemos que la variedad 'Himalaya' de zarzamora presentó el mayor porcentaje de formación de raíces (98.03 % en la clase III), seguida de las variedades 'Smoothstem' de zarzamora (76.47 % en la clase III) y 'Heritage' y 'Amber' de frambuesa (73.33 % y 53.14 % en la clase II, respectivamente). Comparativamente, los valores de enraizamiento en las tres clases fueron mayores en la variedad 'Himalaya'. En la clase II, el porcentaje de enraizamiento de la variedad 'Heritage' fue mayor al de la 'Smoothstem', pero en esta última a su vez, el porcentaje de enraizamiento fue superior en la clase I respecto a las dos variedades de frambuesa (Cuadro 6).

Estos resultados nos sugieren poner a enraizar sólo los brotes de mayor longitud, evitando así pérdidas de material; aumentando con esto el éxito de la propagación in vitro.

4.1.1. Frambuesa

4.1.1.1. Número de raíces

La inducción de raíces por cada brote se vio afectada por la longitud del brote, con base al ANDEVA realizado (Tabla 18 y Tabla T.17 del Anexo 1), aunque las diferencias estadísticas en la formación de raíces por los brotes de cada clase únicamente se presentaron en la variedad 'Amber'.

Se presentó un mayor número de raíces promedio en las plántulas de la clase II (14.35 y 14.15 para la variedad 'Amber' y 'Heritage' respectivamente) (Tabla 19). Cabe mencionar que el número de raíces por brote obtenidos a los 60 días, fue muy superior al reportado por Avitia (8) en el mismo tiempo, para selecciones de la variedad 'Malling Jewell' de frambuesa roja enraizadas in vitro en donde obtuvo un promedio de 1.52 a 1.96 raíces por plántula.

Tabla 18. Significancia de los factores de variación de cada una de las variables evaluadas en el enraizamiento de la frambuesa en base a la longitud del brote.

	V A R I A B L E		
	No. Raíces	Longitud	Peso
Factor 1 (Longitud del brote)	S	S	S
Factor 2 (Variedad)	NS	NS	NS
Inter. 1x2	NS	NS	NS

Significativo (S); No Significativo (NS).

Tabla 19. Comparación de las medias de las variables número, longitud y peso de las raíces de las dos variedades de frambuesa en base a la longitud del brote.

Variedad	Variable	Clase I	Clase II
'Amber'	No. raíces	8.700 b*	14.250 a
	Longitud	3.160 b*	4.530 a
	Peso	0.0257 b*	0.0508 a
'Heritage'	No. raíces	11.400 ab	14.150 a
	Longitud	3.255 b	4.255 ab
	Peso	0.0287 b	0.0409 ab

* Valores con la misma letra estadísticamente iguales (P<0.05).

4.1.1.2. Longitud de las raíces

Al someter los valores obtenidos a un ANDEVA (Tabla 18 y Tabla T.18 del Anexo 1) se presentaron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de las raíces formadas por los brotes de diferente longitud de cada variedad.

Se obtuvieron los mayores valores de longitud de las raíces para la clase II (brotes de 3.1 a 6.0 cm) que para la clase I, al igual que el número de raíces (Tabla 19).

4.1.1.3. Peso

La longitud del brote influyó significativamente en el peso de las raíces en relación a los variables anteriormente discutidas. El peso varió proporcionalmente al número y la longitud de las raíces, obteniendo los mayores pesos medios para la clase II (0.05 g y 0.04 g para la variedad 'Amber' y 'Heritage' respectivamente) (Tablas 18 y 19 y T. 19 del Anexo 1).

4.1.2. Zarzamora

4.1.2.1. Número de raíces

No se presentaron diferencias estadísticas entre las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem' en relación al número de raíces formadas por plántula. Respecto a la longitud de los brotes si se observaron diferencias significativas entre los brotes de diferente clase, presentándose una relación proporcional de mayor número de raíces a mayor longitud de los brotes. La interacción variedad X longitud del brote no influyó en el número de raíces (Tabla 20 y Tabla T.20 del Anexo 1).

En la variedad 'Smoothstem' se presentaron diferencias significativas entre las clases I y II (como sucedió en el caso de la variedad 'Amber' de frambuesa). Mientras que en la variedad 'Himalaya' no hubo diferencias estadísticas entre las clases I y II. Para ambas variedades se presentaron diferencias entre las clases II y III (Tabla 21 y Figura 21).

Tabla 20. Significancia de los factores de variación de cada una de las variables evaluadas en el enraizamiento de la zarzamora en base a la longitud del brote.

	V A R I A B L E		
	No. Raíces	Longitud	Peso
Factor 1 (Longitud del brote)	S	S	S
Factor 2 (Variedad)	NS	NS	NS
Inter. 1X2	NS	NS	NS

Significativo (S); No Significativo (NS).

Tabla 21. Comparación de las medias de las variables número, longitud y peso de las raíces de las dos variedades de zarzamora en base a la longitud de los brotes.

Variedad	Variable	Clase I	Clase II	Clase III
	No. raíces	10.90 c*	18.60 bc	37.10 a
'Himalaya'	Longitud	3.080 b*	5.460 a	6.020 a
	Peso	0.015 c*	0.054 bc	0.101 b
	No. raíces	14.10 c	22.40 b	34.650 a
'Smoothstem'	Longitud	3.365 b	4.575 a	5.245 a
	Peso	0.032 c	0.097 b	0.150 a

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (P < 0 = 0.05)

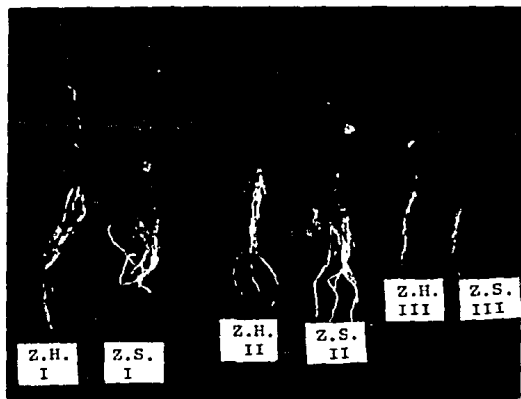


Figura 21. Influencia de la longitud del brote en el sistema radical de las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem' de zamzamora.

4.1.2.2. Longitud de las raíces

La longitud de los brotes afectó significativamente el tamaño de las raíces inducidas (Tabla 20 y Tabla T.21 del Anexo 1), en la variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem'. En ambas variedades se observó una mayor longitud de las raíces a mayor longitud del brote (clases II y III) (Tabla 21).

La variedad y la interacción entre ésta y la longitud de los brotes no ejercieron ninguna influencia significativa en la longitud de las raíces formadas (Tablas 20 y T.21 del Anexo 1).

4.1.2.3. Peso

El peso fresco de las raíces producidas se vio influido por la longitud del brote (Tabla 20 y Tabla T.22 del Anexo 1) y de manera análoga al número y la longitud de las raíces, se presentaron diferencias estadísticas para esta variable.

En relación a la cantidad de raíces inducidas y al tamaño de las mismas, se presentaron los mayores valores de peso fresco en los brotes de la clase III (de más de 6.0 cm); se observó la misma tendencia anteriormente discutida para las otras variables en cada variedad (Tabla 21).

La variedad 'Smoothstem' presentó mayores pesos medios respecto a la variedad 'Himalaya'; esto se debió a que la variedad 'Smoothstem' desarrolló raíces gruesas y ramificadas aunque de menor longitud y en menor número promedio, al considerar únicamente las raíces primarias. Este hecho es significativo ya que en híbridos de Fubus enraizados in vitro han inducido la formación de raíces de primer orden pero ningún tratamiento dió raíces secundarias (47).

4.2. Influencia del grosor de la base del brote

Los porcentajes de enraizamiento de acuerdo al grosor de la base de los brotes, para cada variedad, no presentaron diferencias estadísticas al obtener los siguientes valores para cada una de las variedades: 'Amber': 0.066; 'Heritage': 0.499; 'Himalaya': 0.781; 'Smoothstem': 3.436 y un valor teórico de 5.991 que fue comparado con cada uno de los valores calculados (P < 0.05).

Prácticamente los valores obtenidos en cada clase de grosor basal, resultaron ser un promedio de los porcentajes obtenidos por cada clase de longitud de brote de cada variedad (Cuadros 7 y 8).

Por otra parte, en los brotes puestos a enraizar con diferente diámetro basal y a su vez separados en base a su longitud, se observó aún más claramente la influencia de la longitud de los brotes en la inducción del sistema radical, independientemente del grosor de la base al obtener los valores calculados menores al teórico en las variedades de frambuesa ('Amber': 0.468; 'Heritage': 0.443; teórico: 5.991; $P < 0.05$) y zarzamora ('Himalaya': 6.058; 'Smoothstem': 7.232; teórico: 9.408; $P < 0.05$).

El hecho de que la longitud del brote tenga un efecto significativo en la inducción del sistema radical puede estar relacionado con los niveles endógenos hormonales (8) y el estadio fisiológico de los brotes (edad) (76, 94), ya que una mayor longitud de los brotes se ha relacionado con un mayor vigor (8).

4.2.1. Frambuesa

4.2.1.1. Número de raíces

El número de raíces resultó afectado significativamente por el grosor de la base del brote, como podría esperarse dado que en la frambuesa las raíces son inducidas y no existen iniciales de raíz preformada, es decir, el número de raíces no está predeterminado (8, 45); por lo que, se esperaba que a una mayor superficie de emergencia de raíces la cantidad de raíces producidas por el brote fuera mayor (Tabla 22 y Tabla T.23 del Anexo 1).

Con base en lo anterior, se observó una tendencia a a presentar una mayor inducción de raíces en los brotes de mayor grosor basal (Tabla 23); aún cuando, las diferencias entre éstos valores medios no son estadísticamente significativas para la variedad 'Amber'.

4.2.1.2. Longitud de las raíces

El grosor de la base del brote influyó significativamente en la longitud de las raíces, no así la variedad ni la interacción entre estos dos factores (Tabla 22 y Tabla T.24 del Anexo 1).

Cuadro 7. Influencia del grosor de la base del brote en la formación del sistema radical en las dos variedades de frambuesa.

Variedad	Clase	% Enraizamiento	% de enraizamiento de acuerdo a la longitud y grosor basal del brote	
			Clase I	Clase II
A m b e r'	1	30.90	21.47	40.34
	2	30.80	17.87	43.72
	3	31.17	19.64	42.70
H e r i t a g e	1	48.96	31.12	66.81
	2	49.93	28.42	71.44
	3	49.34	25.56	72.12

Cuadro B. Influencia del grosor de la base del brote en la formación del sistema radical en las dos variedades de zarzamora.

Variedad	Clase	% Enraizamiento	% de enraizamiento en base a la longitud y el grosor de la base del brote		
			Clase I	Clase II	Clase III
Himalaya	1	50.91	26.08	59.09	67.57
	2	50.42	19.35	58.57	73.33
	3	50.25	16.67	52.67	81.422
Smoothstem	1	62.74	32.25	72.22	83.75
	2	61.05	17.39	78.26	87.50
	3	61.58	17.07	76.19	91.50

Tabla 22. Significancia de los factores de variación de cada una de las variables evaluadas en el enraizamiento de la frambuesa con relación al grosor de la base del brote.

	V A R I A B L E		
	No. Raíces	Longitud	Peso
Factor 1 (Grosor basal del brote)	S	S	S
Factor 2 (Variedad)	NS	NS	NS
Inter. 1x2	NS	NS	NS

Significativo (S); No Significativo (NS).

Tabla 23. Comparación de las medias de las variables número, longitud y peso de las raíces de las dos variedades de frambuesa con relación al grosor de la base.

Variedad	Variable	Clase 1	Clase 2	Clase 3
'Amber'	No. raíces	8.20 ab*	9.25 ab	10.55 ab
	Longitud	2.315 c*	2.815 bc	3.780 a
	Peso	0.0128 b*	0.0293 ab	0.0453 a
'Heritage'	No. raíces	7.60 b	10.65 ab	11.15 a
	Longitud	2.195 c	3.425 ab	3.765 a
	Peso	0.0101 b	0.0275 ab	0.0299 ab

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (P < α = 0.05)

Se observó una tendencia a presentar una mayor longitud de las raíces a un mayor diámetro de la base del brote, con lo que se obtuvieron raíces de mayor tamaño en los brotes de la clase 3.

Para la variedad 'Amber' los valores promedio de longitud de las raíces no fueron significativamente diferentes entre los brotes de las clases 1 y 2; las diferencias estadísticas en la variedad 'Heritage' se presentaron entre los brotes de las clases 1 y 2 respecto a los de la clase 1 (Tabla 23).

4.2.1.3. Peso

Al igual que el número y la longitud de las raíces, el peso sólo se vio afectado significativamente por el grosor de la base de los brotes y no por la variedad agronómica o la interacción entre estos dos factores (Tabla 22 y Tabla T.25 del Anexo 1).

En función del número y la longitud de las raíces se se presentan las diferencias estadísticas en los pesos de las raíces, dado que se presenta la misma tendencia (Tabla 23).

4.2.2 Zarzamora

4.2.2.1. Número de raíces

El análisis de varianza con los criterios de clasificación grosor de la base del brote y variedad agronómica mostró diferencias significativas para la variable número de raíces (Tabla 24 y Tabla T.26 del Anexo 1).

Al igual que la frambuesa, los brotes de zarzamora de mayor grosor basal indujeron la formación de mayor cantidad de raíces (Tabla 25). Sin embargo, la formación de mayor número de raíces en los brotes de las clases 2 y 3 también podría deberse a que en las clases de mayor diámetro basal hubiera brotes de mayor longitud, lo cual sí influyó significativamente en la inducción de raíces.

Tabla 24. Significancia de los factores de variación de cada una de las variables evaluadas en el enraizamiento de la zarzamora en base al grosor basal del brote.

	V A R I A B L E		
	No. Raíces	Longitud	Peso
Factor 1 (Grosor basal del brote)	S	NS	S
Factor 2 (Variedad)	NS	NS	S
Inter. 1X2	NS	NS	NS

Significativo (S); No Significativo (NS).

Tabla 25. Comparación de las medias de las variables número, longitud y peso de las raíces de las dos variedades de zarzamora en base al grosor de la base del brote.

Variedad	Variable	Clase 1	Clase 2	Clase 3	
	No. raíces	10.050 b*	14.550 ab	19.40 a	
	'Himalaya'	Longitud	2.380	3.510	3.250
	Peso	0.0155 c*	0.0277 bc	0.0478 ab	
		No. raíces	10.250 b	16.100 ab	18.40 a
	'Smoothstem'	Longitud	3.085	3.160	3.150
		Peso	0.0282 bc	0.0494 ab	0.0679 a

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (P < α = 0.05)

4.2.2.2. Longitud de las raíces

Al realizar el ANDEVA para la longitud de las raíces, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas, y por lo el grosor de la base del brote no influyó en la longitud de las raíces producidas por los brotes de cada clase ni se presentaron diferencias entre las dos variedades de zarzamora (Tablas 24 y 25 y Tabla T. 27 del Anexo 1).

4.2.2.3. Peso

El peso de las raíces presentó diferencias significativas, siendo el grosor de la base la fuente de variación y sin influir la variedad agronómica ni la interacción entre ambos factores (Tablas 24 y 25 y Tabla T.28 del Anexo 1).

El peso de éstas es un parámetro importante, ya que involucra un mayor grosor o raíces ramificadas, lo cual indica un sistema radical más vigoroso. Los mayores pesos se presentaron en las clases 2 y 3 de la variedad 'Smoothstem' y en la clase 3 de la variedad 'Himalaya' (Tabla 25).

5. ADAPTACION A CONDICIONES AMBIENTALES

La adaptación de las plántulas a condiciones ambientales se llevo a cabo durante la etapa de enraizamiento, dado que ésta fue realizada fuera de los tubos de cultivo.

Así, la transición paulatina de un modo de nutrición heterotrófico a uno autotrófico y la normalización del balance hídrico (30, 114) se iniciaron cuando los brotes fueron transferidos de los cultivos in vitro a los almácigos donde enraizaron. Las plántulas se encuentran adaptadas actualmente a condiciones de invernadero. Las plántulas han crecido hasta alcanzar longitudes mayores a los 30 cm, después de tres meses de haber sido transferidas de los cultivos in vitro a condiciones ambientales (Figura 22) y presentan un estado de completa sanidad.

Los brotes enraizados en agrolita sobrevivieron cuando fueron transferidos a la mezcla de tierra:agrolita, y

más de un 90% de los brotes enraizados in vitro sobrevivió cuando fueron transferidos directamente a las macetas con la mezcla de tierra negra y agrolita.

El alto porcentaje de sobrevivencia de las plantas de frambuesa y zarzamora transferidas del cultivo in vitro a condiciones ambientales puede considerarse en un sentido comercial como un éxito del cultivo de tejidos vegetales, en el área de la propagación de plantas (31); aún cuando resta esperar su comportamiento, desarrollo y fructificación en campo.



Figura 22. Zarzamora var. 'Smoothstem' obtenida in vitro, adaptada a condiciones ambientales.

CONCLUSIONES

- El tipo de agente desinfectante empleado y el tiempo de exposición, influyen en la contaminación de los cultivos y en el grado de oxidación de los ápices vegetativos; se encontró que el tratamiento de desinfección más adecuado para establecer a condiciones in vitro yemas y ápices vegetativos de las variedades estudiadas de frambuesa y zarzamora es el hipoclorito de sodio al 1.2 % v/v durante 30 minutos.
- La adición de agentes antioxidantes como la (L-Cisteína) al medio de cultivo es necesaria para evitar la oxidación y muerte del tejido; es también recomendable el pretratamiento a bajas temperaturas (7° C) y oscuridad antes de poner a incubar el material vegetativo recién sembrado.
- El balance hormonal y el medio de cultivo son esenciales para lograr el establecimiento y desarrollo inicial de los ápices y yemas vegetativas; éste resultó favorable con 1.0 mg/l de benciladenina y 0.1 mg/l de ácido indolbutírico en el medio A-3 (sales basales de Murashige y Skoog con sus macroelementos reducidos al 25 % de su concentración y el doble de sales de hierro) para la frambuesa y en el medio MS-1 (sales basales de Murashige y Skoog) para la zarzamora.
- En la proliferación se presentaron diferencias de respuesta al cultivo in vitro entre la frambuesa y la zarzamora con relación a la inducción de brotes y hojas, la longitud de los brotes y la biomasa producida por cada especie. La zarzamora en el mejor tratamiento resultó el el doble de prolífica (numero de brotes por inóculo) con respecto a la frambuesa. Los factores que influyeron en la respuesta fueron la consistencia y la concentración de sales nutritivas en el medio de cultivo, principalmente, así como la variedad agronómica y la interacción entre el medio de cultivo y la consistencia.
- Entre las variedades de frambuesa se presentaron diferencias en la respuesta al tipo de consistencia del medio de cultivo, para la variedad 'Amber' el mejor tratamiento la consistencia líquida del medio A-1 (sales basales de Anderson con 0.8 mg/l de BA) y la consistencia sólida del mismo medio para la variedad 'Heritage'.

- Para las dos variedades de zarzamora el mejor medio de proliferación (producción de brotes) resultó ser el MS-1 (sales basales de Murahige y Skoog al 100 % de su concentración), con consistencia sólida y con la concentración hormonal de 0.8 mg/l de benciladenina.
- La intensidad luminosa influyó en la producción y el tamaño de los brotes producidos por la variedad 'Amber' de frambuesa; se obtuvo una mayor proliferación y longitud de los brotes en la intensidad luminosa baja (972 lux). En la variedad 'Heritage' el número de brotes no resultó afectado pero sí el tamaño de los brotes que fue mayor en las intensidades luminosas media y alta (1296 y 1620 lux).
- En las dos variedades de zarzamora, la intensidad luminosa no afectó la inducción y el tamaño de los brotes, bajo las condiciones de cultivo in vitro estudiadas, en las intensidades probadas de 972, 1296 y 1620 lux.
- La longitud del brote afectó la inducción del sistema radical y la cantidad y tamaño de las raíces producidas por las variedades frambuesa, enraizando en mayor proporción los brotes mayores de 3.0 cm de longitud.
- La inducción y desarrollo del sistema radical en la zarzamora, fue determinada por la longitud del brote, obteniendo los mayores porcentajes de enraizamiento así como mayor número y longitud de las raíces en los brotes mayores a 3.0 y 6.0 cm.
- La formación del sistema radical no fue afectada por el grosor de la base del brote en la frambuesa, pero sí influyó en la cantidad y el tamaño de las raíces producidas, se presentaron raíces de mayor longitud y peso en los brotes con mayor diámetro basal.
- El grosor de la base del brote influyó en el número y tamaño de las raíces en los brotes de zarzamora enraizados pero no en la inducción del sistema radical; en los brotes con mayor grosor de la base se obtuvieron más raíces y de mayor longitud.

- Los brotes obtenidos in vitro pueden enraizarse exitosamente fuera de los tubos de cultivo si se mantienen condiciones de alta humedad relativa para transferirse posteriormente a condiciones de suelo hasta lograr su adaptación a condiciones ambientales.

- Las plántulas enraizadas in vitro pueden transferirse directamente a suelo, sin tener por esto pérdidas considerables de material.

- La técnica de cultivo de tejidos vegetales, en la propagación de plantas de frambuesa y zarzamora, es una herramienta de gran utilidad, debido a sus cualidades y al uso potencial de estas especies.

ANEXO 1
(TABLAS DE ANALISIS DE VARIZANZA)

Tabla T.1. ANDEVA para la variable: Número de Brotes de las variedades 'Amber' y 'Heritage' de frambuesa durante la etapa de proliferación.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	144.006	1	144.006	12.3999	0.000830
Factor 2	402.313	2	201.156	17.3209	0.000008
Factor 3	50.139	1	50.139	4.3173	0.036847
Inter.1X2	16.178	2	8.089	0.6965	0.504279
Inter.1X3	162.450	1	162.450	13.9880	0.000505
Inter.2X3	21.644	2	10.822	0.9319	0.601879
Inter.1X2X3	260.400	2	130.200	11.2111	0.000111
Residual	1951.067	168	11.613		
Total	3008.198				
Media Total	54.305				

Fuente de Variación (F.V.); Suma de Cuadrados (S.C.); Grados de Libertad (G.L.); Cuadrados Medios (C.M.); Valores de F (V.F.); Probabilidad asociada (P.A.).
Consistencia (Factor 1); Medio de cultivo (Factor 2); Variedad agronómica (Factor 3).

Tabla T.2. ANDEVA para la variable: Número de Hojas de las variedades 'Amber' y 'Heritage' de frambuesa durante la etapa de proliferación.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	11186.431	1	11186.431	27.2914	0.000017
Factor 2	12161.009	2	6080.504	14.8345	0.000020
Factor 3	2824.269	1	2824.269	6.8903	0.009276
Inter.1x2	475.299	2	237.650	0.5798	0.566417
Inter.1x3	2546.274	1	2546.274	6.2121	0.013083
Inter.2x3	235.745	2	117.872	0.2876	0.754631
Inter.1x2x3	7470.478	2	3735.239	9.1128	0.000373
Residual	68861.195	168	409.888		
Total	105760.703	179			
Media Total	26.538				

Fuente de Variación (F.V.); Suma de Cuadrados (S.C.); Grados de Libertad (G.L.); Cuadrados Medios (C.M.); Valores de F (V.F.); Probabilidad asociada (P.A.).
 Consistencia (Factor 1); Medio de cultivo (Factor 2); Variedad agronómica (Factor 3).

Tabla T.3. ANDEVA para la variable: Longitud de los brotes de las variedades 'Amber' y 'Heritage' de frambuesa durante la etapa de proliferación.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	2.830	1	2.830	5.4849	0.019208
Factor 2	17.212	2	8.606	16.6354	0.000010
Factor 3	2.267	1	2.267	4.3819	0.075502
Inter.1X2	9.703	2	4.851	9.3777	0.000316
Inter.1X3	0.304	1	0.304	0.5881	0.549400
Inter.2X3	0.398	2	0.199	0.3048	0.686852
Inter.1X2X3	2.409	2	1.204	2.3281	0.078523
Residual	86.912	168	0.517		
Total	122.042	179			
Media Total	1.625				

Fuente de Variación (F.V.); Suma de Cuadrados (S.C.); Grados de Libertad (G.L.); Cuadrados Medios (C.M.); Valores de F (V.F.); Probabilidad Asociada (P.A.).
 Consistencia (Factor 1); Medio de Cultivo (Factor 2); Variedad agronómica (Factor 3).

Tabla T.4. ANDEVA para la variable: Peso fresco, de las variedades 'Amber' y 'Heritage' de frambuesa durante la etapa de proliferación.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	0.285	1	0.285	12.4123	0.000877
Factor 2	0.078	2	0.039	1.7107	0.181849
Factor 3	0.053	1	0.053	2.3030	0.126978
Inter.1X2	0.640	2	0.320	13.9543	0.000029
Inter.1X3	0.068	1	0.068	2.9582	0.083398
Inter.2X3	0.060	2	0.030	1.3117	0.271215
Inter.1X2X3	0.110	2	0.055	2.3950	0.092216
Residual	3.853	168			
Total	5.147	179			
Media Total	0.150				

Fuente de Variación (F.V.); Suma de Cuadrados (S.C.); Grados de Libertad (G.L.); Cuadrados Medios (C.M.); Valores de F (V.F.); Probabilidad Asociada (P.A.).
 Consistencia (Factor 1); Medio de cultivo (Factor 2); Variedad agronómica (Factor 3).

Tabla T.5. ANDEVA para la variable: Número de brotes de las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem' de zarzamora, durante la etapa de proliferación.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	4997.019	1	4997.019	107.0465	0.000000
Factor 2	1159.340	2	579.670	12.5105	0.000057
Factor 3	287.788	1	287.788	6.2111	0.013090
Inter.1X2	804.421	2	402.211	8.6806	0.000491
Inter.1X3	137.988	1	137.988	2.9781	0.002366
Inter.2X3	52.568	2	26.284	0.5673	0.573534
Inter.1X2X3	26.968	2	13.484	0.2910	0.752132
Residual	7784.206	168	46.335		
Total	15250.304	179			
Media Total	7.813				

Fuente de Variación (F.V.); Suma de Cuadrados (S.C.); Grados de Libertad (G.L.); Cuadrados Medios (C.M.); Valores de F (V.F.); Probabilidad Asociada (P.A.).
 Consistencia (Factor 1); Medio de Cultivo (Factor 2); Variedad agronómica (Factor 3).

Tabla T.6. ANDEVA para la variable: Número de hojas de las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem' de zarzamora, durante la etapa de proliferación.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	102102.164	1	102102.164	115.1609	0.000000
Factor 2	20028.082	2	14014.041	15.8064	0.000014
Factor 3	10656.778	1	10656.778	12.0198	0.001016
Inter.1X2	17570.183	2	8785.406	9.9090	0.000230
Inter.1X3	3017.607	1	3017.607	3.4036	0.063336
Inter.2X3	496.312	2	248.156	0.2799	0.760223
Inter.1X2X3	251.245	2	125.622	0.1417	0.868266
Residual	148949.547	168	886.604		
Total	311072.438	179			
Media Total	33.883				

Fuente de Variación (F.V.); Suma de Cuadrados (S.C.); Grados de Libertad (G.L.); Cuadrados Medios (C.M.); Valores de F (V.F.); Probabilidad Asociada (P.A.)
 Consistencia (Factor 1); Medio de Cultivo (Factor 2); Variedad agronómica (factor 3).

Tabla T.7. ANDEVA para la variable: Longitud de los brotes de las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem' de zarzamora, durante la etapa de proliferación.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	9.112	1	9.112	18.0900	0.000143
Factor 2	13.242	2	6.621	13.1441	0.000042
Factor 3	0.421	1	0.421	0.8348	0.634822
Inter.1x2	1.729	2	0.865	1.7162	0.180892
Inter.1x3	2.863	1	2.863	5.6031	0.017272
Inter.2x3	1.393	2	0.696	1.3827	0.252535
Intér.1x2x3	4.874	2	2.437	4.8380	0.007167
Residual	84.627	168	0.504		
Total	118.261	179			
Media Total	1.942				

Fuente de Variación (F.V.); Suma de Cuadrados (S.C.); Grados de Libertad (G.L.); Cuadrados Medios (C.M.); Valores de F (V.F.); Probabilidad Asociada (P.A.)
 Consistencia (Factor 1); Medio de Cultivo (Factor 2); Variedad agronómica (Factor 3).

Tabla T.8. ANDEVA para la variable: Peso fresco, de las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem' de zarzamora, durante la etapa de proliferación.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	3.086	1	3.086	48.0918	0.000001
Factor 2	1.348	2	0.674	10.5026	0.000163
Factor 3	0.004	1	0.004	0.0679	0.790770
Inter.1X2	1.001	2	0.500	7.7984	0.000889
Inter.1X3	0.001	1	0.001	0.0095	0.919500
Inter.2X3	0.066	2	0.033	0.5149	0.604246
Inter.1X2X3	0.062	2	0.031	0.4805	0.625186
Residual	10.782	168	0.064		
Total	16.350	169			
Media Total	0.205				

Fuente de Variación (F.V.); Suma de Cuadrados (S.C.); Grados de Libertad (G.L.); Cuadrados Medios (C.M.); Valores de F (V.F.); Probabilidad Asociada (P.A.)
 Consistencia (Factor 1); Medio de cultivo (Factor 2); Variedad agrónomica (Factor 3).

Tabla T.9. ANDEVA para la variable: Número de brotes para las variedades 'Amber' y 'Heritage', con tres intensidades luminosas durante la etapa de proliferación.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	219.822	2	109.911	3.9141	0.02307
Factor 2	494.677	1	494.677	17.6161	0.00021
Inter.1x2	219.822	2	109.911	3.9141	0.02307
Residual	2538.800	84	28.081		
Total	3293.122	89			

Tabla T.10. ANDEVA para la variable: Número de hojas de las variedades 'Amber' y 'Heritage' de frambuesa, con tres intensidades luminosas durante la etapa de proliferación.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	6414.472	2	3207.236	3.4204	0.03621
Factor 2	11673.587	1	11673.587	12.4493	0.00102
Inter.1x2	3629.423	2	1814.712	1.9353	0.14873
Residual	78766.125	84	937.692		
Total	100483.656	89			

Fuente de Variación (F.V.); Suma de Cuadrados (S.C.); Grados de Libertad (G.L.); Cuadrados Medios (C.M.); Valores de F (V.F.); Probabilidad Asociada (P.A.)
 Intensidad luminosa (Factor 1); Variedad agronómica (Factor 2).

Tabla T.11. ANDEVA para la variable: Longitud de los brotes de las variedades 'Amber' y 'Heritage' de frambuesa con tres intensidades luminosas, durante la etapa de proliferación.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	1.679	2	0.849	0.9081	0.59020
Factor 2	9.025	1	9.025	9.6496	0.00294
Inter.1X2	1.683	2	0.841	0.8996	0.58668
Residual	78.563	84	0.935		
Total	90.969	89			

Tabla T.12. ANDEVA para la variable: Peso fresco, de las variedades 'Amber' y 'Heritage' de frambuesa con tres intensidades luminosas, durante la etapa de proliferación.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	0.143	2	0.071	2.1487	0.12094
Factor 2	0.024	1	0.024	0.7345	0.60172
Inter.1X2	0.533	2	0.267	8.0177	0.00096
Residual	2.794	84	0.033		
Total	3.495	89			

Fuente de Variación (F.V.); Suma de Cuadrados (S.C.); Grados de Libertad (G.L.); Cuadrados Medios (C.M.); Valores de F (V.F.); Probabilidad Asociada (P.A.)
Intensidad Luminosa (Factor 1); Variedad agronómica (Factor 2).

Tabla T.13. ANDEVA para la variable: Número de brotes de las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem' de zarzamora con tres intensidades luminosas, durante la etapa de proliferación.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	299.288	2	149.644	1.0112	0.36951
Factor 2	159.999	1	159.999	1.0012	0.30180
Inter.1x2	120.800	2	60.400	0.4082	0.67137
Residual	12430.400	84	147.981		
Total	13010.487	89			

Tabla T.14. ANDEVA para la variable: Número de hojas de las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem' de zarzamora con tres intensidades luminosas durante la etapa de proliferación.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	3515.478	2	1757.739	0.5691	0.57348
Factor 2	2822.383	1	2822.383	0.9138	0.65627
Inter.1x2	6519.255	2	3259.628	1.0554	0.35365
Residual	259440.641	84	3088.579		
Total	272297.844	89			

Fuente de Variación (F.V.); Suma de Cuadrados (S.C.); Grados de Libertas (G.L.); Cuadrados Medios (C.M.); Valores de F (V.F.); Probabilidad Asociada (P.A.)

Intensidad Luminosa (Factor 1); Variedad agronómica (Factor 2).

Tabla T.15. ANDEVA para la variable: Longitud de los brotes de las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem' de zarzamora con tres intensidades luminosas durante la etapa de proliferación.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	0.536	2	0.268	0.2485	0.78372
Factor 2	15.047	1	15.047	13.9440	0.00061
Inter.1x2	1.884	2	0.942	0.8730	0.57557
Residual	90.645	84	1.079		
Total	108.113	89			

Tabla T.16. ANDEVA para la variable: Peso fresco, de las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem' de zarzamora con tres intensidades luminosas, durante la etapa de proliferación.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	0.934	2	0.467	1.1087	0.33531
Factor 2	0.740	1	0.740	1.7566	0.18550
Inter.1x2	0.912	2	0.456	1.0831	0.34100
Residual	35.382	84	0.421		
Total	37.969	89			

Fuente de Variación (F.V.); Suma de Cuadrados (S.C.); Grados de Libertad (G.L.); Cuadrados Medios (C.M.); Valores de F (V.F.); Probabilidad Asociada (P.A.)
Intensidad luminosa (Factor 1); Variedad agronómica (Factor 2).

Tabla T.17. ANDEVA para la variable: Número de raíces de las variedades 'Amber' y 'Heritage', con base en la longitud de los brotes.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	352.799	1	352.799	7.8260	0.00658
Factor 2	31.250	1	31.250	0.6932	0.50733
Inter.1X2	42.050	1	42.050	0.9328	0.66117
Residual	3426.100	76	45.080		
Total	3852.200	79			

Tabla T.18. ANDEVA para la variable: Longitud de las raíces de las variedades 'Amber' y 'Heritage', con base en la longitud de los brotes.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	29.282	1	29.282	8.8304	0.00423
Factor 2	0.265	1	0.265	0.0798	0.77521
Inter.1X2	0.882	1	0.882	0.2660	0.61376
Residual	252.019	76	3.316		
Total	282.448	79			

Fuente de Variación (F.V.); Suma de Cuadrados (S.C.); Grados de Libertad (G.L.); Cuadrados Medios (C.M.); Valores de F (V.F.); Probabilidad Asociada (P.A.)
Clase-longitud del brote (Factor 1); Variedad agronomica (Factor 2).

Tabla T.19. ANDEVA para la variable: Peso fresco de las raíces de las variedades 'Amber' y 'Heritage', con base en la longitud del brote.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	0.007	1	0.007	8.7602	0.00436
Factor 2	0.000	1	0.000	0.3021	0.59089
Inter.1x2	0.001	1	0.001	1.0326	0.31572
Residual	0.061	76	0.001		
Total	0.069	79			

Tabla T.20. ANDEVA para la variable: Número de raíces de las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem', con base en la longitud del brote.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	11290.410	2	5645.205	34.2104	0.00000
Factor 2	69.007	1	69.007	0.4182	0.52630
Inter.1x2	237.817	2	118.908	0.7206	0.50692
Residual	18811.547	114	165.014		
Total	30408.791	119			

Fuente de Variación (F.V.); Suma de Cuadrados (S.C.); Grados de Libertad (G.L.); Cuadrados Medios (C.M.); Valores de F (V.F.); Probabilidad Asociada (P.A.)
Clase-longitud del brote (Factor 1); Variedad agronomica (Factor 2).

Tabla T.21. ANDEVA para la variable: Longitud de las raíces de las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem', con base en la longitud del brote.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	F.A.
Factor 1	125.444	2	62.722	13.0804	0.00005
Factor 2	6.302	1	6.302	1.3143	0.25269
Inter.1x2	8.349	2	4.174	0.8705	0.57549
Residual	546.644	114	4.795		
Total	686.740	119			

Tabla T.22. ANDEVA para la variable: Pesqfresco de las raíces de las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem' con base en la longitud del brote.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	F.A.
Factor 1	0.210	2	0.105	18.1977	0.00001
Factor 2	0.039	1	0.039	6.7922	0.1010
Inter.1x2	0.006	2	0.003	0.4921	0.61843
Residual	0.659	114	0.006		
Total	0.914	119			

Fuente de Variación (F.V.); Suma de Cuadrados (S.C.); Grados de Libertad (G.L.); Cuadrados Medios (C.M.); Valores de F (V.F.); Probabilidad Asociada (F.A.) Clase-longitud de la base (Factor 1); Variedad Agronómica (Factor 2).

Tabla T.23. ANDEVA para la variable: Número de raíces de las variedades 'Amber' y 'Heritage', de acuerdo al grosor de la base del brote.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	169.867	2	84.933	3.4216	0.03496
Factor 2	6.533	1	6.533	0.2632	0.61518
Inter.1x2	33.267	2	16.633	0.6701	0.51828
Residual	2829.799	114	24.823		
Total	3039.466	119			

Tabla T.24. ANDEVA para la variable: Longitud de las raíces de las variedades 'Amber' y 'Heritage', de acuerdo al grosor de la base del brote.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	39.795	2	19.898	10.1757	0.00023
Factor 2	0.752	1	0.752	0.3846	0.54355
Inter.1x2	9.677	2	4.839	2.4745	0.08674
Residual	222.915	114	1.955		
Total	273.140	119			

Fuente de Variación (F.V.); Suma de Cuadrados (S.C.); Grados de Libertad (G.L.); Cuadrados Medios (C.M.); Valores de F (V.F.); Probabilidad Asociada (P.A.) Clase-grosor de la base (Factor 1); Variedad agronómica (Factor 2).

Tabla T.25. ANDEVA para la variable: Peso fresco de las raíces de las variedades 'Amber' y 'Heritage', de acuerdo al grosor de la base del brote.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1-	0.013	2	0.007	6.5110	0.00249
Factor 2	0.001	1	0.001	1.3101	0.25346
Inter.1x2	0.002	2	0.001	0.9481	0.60739
Residual	0.116	114	0.001		
Total	0.133	119			

Tabla T.26. ANDEVA para la variable: Número de raíces de las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem', de acuerdo al grosor de la base del brote.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	1548.315	2	774.158	5.9068	0.00399
Factor 2	1.875	1	1.875	0.0143	0.90079
Inter.1x2	32.550	2	16.275	0.1242	0.88323
Residual	14941.049	114	131.062		
Total	16523.789	119			

Fuente de Variación (F.V.); Suma de Cuadrados (S.C.); Grados de Libertad (G.L.); Cuadrados Medios (C.M.); Valores de F (V.F.); Probabilidad asociada (P.A.) Clase-grosor de la base (Factor 1); Variedad agronómica (Factor 2).

Tabla T.27. ANDEVA para la variable: Longitud de las raíces de las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem', de acuerdo al grosor de la base de los brotes.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	7.997	2	3.999	1.3397	0.26505
Factor 2	0.217	1	0.217	0.0726	0.78436
Inter.1x2	6.079	2	3.039	1.0183	0.36584
Residual	340.264	114	2.985		
Total	354.556	119			

Tabla T.28. ANDEVA para la variable: Peso fresco de las raíces de las variedades 'Himalaya' y 'Smoothstem', de acuerdo al grosor de la base.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	V.F.	P.A.
Factor 1	0.026	2	0.013	8.6017	0.00058
Factor 2	0.010	1	0.010	6.5682	0.01129
Inter.1x2	0.000	2	0.000	0.1535	0.85844
Residual	0.172	114	0.002		
Total	0.209	119			

Fuente de Variación (F.V.); Suma de Cuadrados (S.C.); Grados de Libertad (G.L.); Cuadrados Medios (C.M.); Valores de F (V.F.); Probabilidad asociada (P.A.)

Clase-grosor de la base (Factor 1); Variedad agronómica (Factor 2).

APENDICE A

Tecto-60
(Fungicida de contacto y sistémico)

Thiabendazole 2-(4-thiazolyl)-benzimidazole no menos de 60 %
Diluyentes humectantes no más de 40 %

Gro-Green
(Fertilizante foliar)

Análisis de Fórmula	Como elemento (%)
Nitrógeno total no menos de (N)	20
Nitrógeno nítrico	3
Nitrógeno amoniacal	9
Nitrógeno de urea	8
Nitrógeno insoluble en agua	0
Acido fosfórico disponible	30
Acido fosfórico insoluble	0
Potasio soluble en agua	10
Alimento total disponible para plantas	60
Cloro	0
Derivativos: Urea, fosfato monoamónico, fosfato diamónico y nitrato de potasio	
Ca de fosfato monobásico de calcio	1
Mg de sulfato de magnesio	1
Fe de sulfato de hierro	0.1
B de bórax	0.1
Cu de sulfato de cobre	0.1
Mn de sulfato de manganeso	0.1
Zn de sulfato de zinc	0.1
Mo de molibdato sódico	0.1
Co de sulfato de cobalto	0.1
S de sulfatos	0.1
Acido Naftalen acético	0.002
Sulfato sódico de dodecylbenceno	2

Radix F 1500
(Fitohormonas para enraizar estacas y acodos)

Cada 100 g contienen:

Acido Indol Butírico	1500 ppm
Acido Naftalen Acético	200 ppm
n-triclorometilmercapto-4-ciclohexen-1,2,dicarboxamida	40000 ppm

Vehículo cbp 100g

BIBLIOGRAFIA

1. Abbot, A. J., 1978. Practice and promise of micropropagation of woody species. Acta Hort. 7:13-20.
2. A.I.D., 1967. El Cultivo de la Frambuesa. Centro Regional de Ayuda Técnica. Mexico.
3. Aldrufeu, A.; M. Pages; J. Messeguer and E. Male, 1983. In vitro rhizogenesis of Rosa sp. in different substrates. Acta Hort. 150:315-323.
4. Amor, R. L., 1974. Ecology and control of blackberry (Rubus fruticosus L. agg.) II. Reproduction. Weed Research 14: 231-238.
5. Amorim, H. V.; D. K. Dougall and W. R. Sharp, 1977. The effect of carbohydrate and nitrogen concentration on phenol synthesis in Paul's Scarlet Rose cells grown in tissue culture. Physiol. Plant 39:91-95.
6. Anderson, W. C., 1980. Tissue culture propagation of red and black raspberries Rubus occidentalis and R. idaeus. Acta Hort. 7: 13-20.
7. Avitia, E. G., 1987. Comunicación personal.
8. Avitia, E. G., 1985. Propagación in vitro de selecciones de frambuesa roja (Rubus idaeus L.). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
9. Babić, Y. and M. Nesković, 1984. Propagation of three blackberry cultivars from small apical buds in vitro. J. Hort. Sci 59(2):183-185.
10. Barba, A. A., 1987. Cultivo de callos. En: Cultivo de Tejidos Vegetales, Hurtado, D. y M. Merino (Eds.). Trillas, México: 93-100.
11. Barba, A. A., 1987. Reguladores del crecimiento vegetal. En: Cultivo de Tejidos Vegetales, Hurtado, D. y M. Merino (Eds.). Trillas. México: 48-66.
12. Bernasconi, P., P. e. Pilet and F. Jollès, 1985. A one-step purification of a plant lysozyme from in vitro cultures of Rubus hispidus. F.E.F.S. 186(2):263-266.
13. Bianchini, F. y F. Corbetta, 1974. Frutos de la Tierra: Atlas de Plantas Alimenticias. AEDOS, Barcelona.

14. Bidwell, R. G. S., 1979. Fisiologia Vegetal. A.G.T. Editor. México.
15. Bojtschewa, R., 1986. [Preliminary trials of new soviet raspberry varieties]. Internationale Zeif-Schriif der Landwirtschaft (Abs) 2:166-167.
16. Bounous, G., 1985. Arbusti da frutto in Collina e Montagna (Lamponi, rovi, ribes, mirtilli). Edagricole. Bologna, Italy.
17. Brainerd, K. E. and L. H. Fuchigami, 1981. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106(4):515-518.
18. Brainerd, K. E.; L. H. Fuchigami; S. Wiattkowski and S. Clark, 1981. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' Plum grown under different environments. HortScience 16(2):173-175.
19. Broome, D. C. and R. H. Zimmerman, 1978. In vitro propagation on blackberry. HortScience 14(6):726-727.
20. Burrows, W., 1974. Tratado de Microbiologia. Interamericana. México. 20a. ed.
21. Caldwell, J. D., 1984. Blackberry Propagation. HortScience 19(2):13-14.
22. Carrillo, G. G. y J. L. Mendoza, 1979. Efecto de productos naturales sobre el desarrollo in vitro de yemas de Rubus sp. Separado de furrialba 29(14):299-303.
23. Cochran, N. y G. Cox, 1965. Diseños Experimentales. Trillas. México.
24. De Fossard, R. A., 1981. Plant Issue Culture Propagation. Filmiche Corporation, Australia.
25. De Fossard, R. A., 1981. Issue Culture for Plant Propagators. Department of Botany, The University of New England, Armidale, Australia.
26. Devlin, R.M. Fisiologia Vegetal. Omega, Barcelona. 4a. ed.
27. Dodds, J. H; and L. W. Roberts, 1982. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press, England.
28. Donnelly, D. J.; R. S. Smith and F. C. Mellor, 1980. In vitro culture of three Rubus species. Acta Hort.

29. Donnelly, D. J. and W. E. Vidaver, 1984. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. J. Amer. Soc. Hort. Sci 109(2):172-176.
30. Donnelly, D. J. and W. E. Vidaver, 1984. Pigment content and gas exchange of red raspberry in vitro and ex vitro. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109(2):177-181.
31. Donnelly, D. J.; W. E. Vidaver and K. Colbow, 1984. Fixation of CO₂ in Tissue Cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. Plant Cell Tissue Organ Culture 3:313-317.
32. Donnelly, D. J.; W. E. Vidaver and K. Y. Lee, 1985. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after to transfer to soil. Plant Cell Tissue Organ Culture 4:43-50.
33. Elder, J.; P. Benveniste and P. Fontenau, 1977. In vitro of squalene 2,3-epoxide to alpha-amyirin by microsomes from bramble cell suspension culture. Phytochemistry 16:490-492.
34. Fuchigami, L. H.; T. Y. Cheng and A. Soelder, 1981. Abaxial Transpiration and water loss in aseptically cultured plum. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106(4):519-522.
35. Galletta, G. and R. L. Puryear, 1983. A method for Rubus embryo culture. Amer. Soc. Hort Sci (Abs) 18(4):174.
36. Gardner, E. J., 1980. Principios de Genética. Limusa. México. 5a. ed.
37. Gebhard, K., 1985. Development of a sterile cultivation system for rooting of shoot tip cultures (red raspberries) in Duroplast foam. Plant Science 39:141-148.
38. George, E. F. and F. D. Sherrington, 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exagenetics Limited. U.S.A.
39. Gorni, F., 1983. Commercializzazione e Conservazione dei piccoli frutti. I.V.T.P.A. Vol. VI. Italy.
40. Halfacre, R. G. and J. A. Gorden, 1979. Horticulture. McGraw Hill Book Company, U.S.A.
41. Harper International (ED.), 1973. Microbiology. Including

42. Harper, P., 1978. Tissue culture propagation on Blackberry Taiberry. Hort. Res. 10: 141-143.
43. Hartman, H. T. y D. E. Kester, 1980. Propagación de Plantas, principios y prácticas. C.E.C.S.A., México.
44. Hasegawa, F. M., 1979. In vitro propagation of Rose. HortScience 14(5):610-612.
45. Hernández, V. L., 1981. Introducción de síntomas por carencias nutricionales en Crisantemo (Chrysanthemum morifolium) por el sistema de cultivo hidropónico. tesis Profesional. E.N.E.P. Iztacala, U.N.A.M. México.
46. Herrera, E., 1981. Light for growing plants indoors. Cooperative Extension Service New Mexico State University, U.S.A.
47. Hicks, G. S., 1980. Patterns of Organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. The Botanical Rev. 46:1-23.
48. Hurtado, D., 1987. Adaptación de plantas obtenidas in vitro a condiciones naturales. En: Cultivo de Tejidos Vegetales. Hurtado, D. y M. Merino (Eds.). Trillas, México: 154-161.
49. James, D. J., 1979. The role of auxins and phloroglucinol in adventitious root formation in Rubus and Fragaria grown in vitro. J. Hort. Sci. 54(4):273-277.
50. James, D. J.; V. H. Knight and I. J. Thurbon, 1980. Micropropagation of red raspberry and the influence of phloroglucinol. Scientia Hort. 12:313-319.
51. Jennings, D. L., 1972. Aberrant Segregation of a gene in the raspberry and its association with effects on seed development. Heredity 29:83-90.
52. Jennings, D. L., 1967. Balanced lethals and polymorphism in Rubus idaeus. Heredity 22: 465-479.
53. Jennings, D. L., 1976. Raspberries and blackberries Rubus (Rosaceae). In: Evolution of Crop Plants. Simmonds, N. W. (Ed.). Longman, U.S.A.: 251-254.
54. Jennings, D. L. and R. Ingram, 1983. Hybrids of Rubus parviflorus (Nutt) with raspberry and blackberry

and the inheritance of spinlessness derived from this species. Crop. Res. (Hort. Res.) 23:95-101.

55. Ke, S.; R. M. Skirvin; K. D. McFeeters; A. G. Otterbacher and G. Galletta, 1985. In vitro germination and growth of Rubus seeds and embryos. HortSci. 20(6):1047-1049.
56. Labastida, V. C., 1987. El valor de la investigación. Agro-Síntesis 18(1):70-71.
57. Larsson, E. G. K., 1969. Experimental taxonomy as a base for breeding in northern Rubi. Hereditas 63:283-351.
58. Lawrence, F. J., 1986. A review of interspecific hybridization in Rubus. HortSci. 21(1):50-61.
59. Levine, L., 1979. Biología del gen. Omega, Barcelona.
60. Lipe, J. A. and L. W. Martin, 1984. Culture and management of blackberries in the United States. HortSci. 19(2):10-12.
61. Luna, R. B., 1982. Propagación in vitro de la orquídea Laelia anceps var. alba. Tesis Profesional. Fac. Ciencias, U.N.A.M. México.
62. Lundergan, C. A. and J. A. Carls, 1984. Acceleration of the reproductive cycle of the cultivated blackberry. HortSci. 19(1):102-103.
63. Maage, F., 1986. Growth responses and physiological studies in red raspberry plants treated with growth regulators. Acta Hort. 183:291-296.
64. Maene, L. J. and F. C. Debergh, 1985. Problems related to in vitro rooting of in vitro propagated shoots. In: Advances in Agricultural Biotechnology. In vitro Techniques. Propagation and Long Term Storage. Schafer-Menhur, A. (Ed.). Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. Belgium: 59-72.
65. Marquez, M. J., 1987. Probabilidad y Estadística para ciencias químico-biológicas. E.N.E.F. Zaragoza, U.N.A.M.
66. Mazza, G. and M. W. Hodgins, 1985. Benzaldehyde, a major aroma component of saskatoon berries. HortSci. 20(4):742-744.
67. Merino, M., 1987. Medio de Cultivo. En: Cultivo de Tejidos Vegetales. Hurtado, D. y M. Merino (Eds.). Trillas. México: 67-85.

68. Monfredini, M. y Pontali, M., 1985. Competizione fra la fase vegetativa e la fase produttiva nei lamponi non riforenti. Terra trentina 27:37-41.
69. Moore, J. N., 1984. Blackberry breeding. HortScience 19(2):3-5.
70. Moore, J. N.; G. R. Brown and C. Lundergan, 1979. Effect of duration acid scarification on endocarp thickness and seedling emergence of blackberries. HortSci. 9(1-3):204-205.
71. Morton, H. E., 1954. Alcohols. In: Antiseptics, disinfectants, fungicides and chemical and physical sterilization. Reedish, F. G. (Ed.). Lea and Febiger, U.S.A.
72. Muhitch, M. J. and J. S. Fletcher, 1985. Influence of culture age and spermidine treatment on the accumulation of phenolic compounds in suspension cultures. Plant. Physiol. 78:25-28.
73. Murashige, T., 1977. Current status of plant cell and organ cultures. HortScience 12(2):127-130.
74. Murashige, T., 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25:135-166.
75. Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
76. Narayanaswamy, S., 1977. Regeneration of plant from tissue culture. In: Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Reinert, J. and Y. P. S. Bajaj (Eds.). Springer - Verlag, U.S.A.: 179-206.
77. Navarro, U. S., 1987. Cultivo de meristemas. En: Cultivo de Tejidos Vegetales. Hurtado, D. y M. Merino (Eds.). Trillas, México: 133-148.
78. Norton, M. E. and A. A. Doe, 1982. In vitro propagation of ornamental Rosaceus plants. HortScience 17(2):190-191.
79. Nybom, H., 1985. Active self-pollination in blackberries (Rubus subgen. Rubus, Rosaceae). Nord. J. Bot. 5(6):521-525.
80. Nybom, H., 1985. Pollen viability assessments in blackberries (Rubus subgen. Rubus). Pl. Syst. Evol. 150:281-290.
81. Durecky, D. F., 1979. Brambles. In: Advances in fruit

breeding. Janick, J. and J. N. Moore (Eds.).
Purdue Univ. Press. U.S.A.: 98-129.

82. Ozias-Akins, P., 1985. Nutrition of plant tissue cultures. In: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vasil, I. K. (Ed.). Academic Press, Inc., Vol 2. U.S.A.: 129-147.
83. Pacheco, S. P., 1972. Cultivo de frambuesas y zarzamoras. Dir. Gral. de Extensión Agrícola Divulgación. Chapingo, México.
84. Pacheco, S. P., 1975. Frambuesa y zarzamora. SAG. CONAFRUT. Serie de Divulgación. Folleto Núm 17, México.
85. Panetta, F. D., 1982. In situ potential for rehabilitation sites dominated by blackberry (Rubus polyanthemus Lindeb). Weed Res. 22:1-6.
86. Pavlis, G. C. and J. N. Moore, 1981. Gene dose effects on cane thorn density and cotyledonary gland number in tetraploid blackberries. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106(6):761-764.
87. Perry, J. L. and J. N. Moore, 1985. Pollen longevity of blackberry cultivars. HortScience 20(4):737-738.
88. Pillet, P. E. and P. Bernasconi, 1984. Rubus hispidus callus cultured in vitro and endogenous lysozyme: growth processes. Plant Science Letters 35:147-151.
89. Pillet, P. E.; J. Jollès and P. Jollès, 1983. Lysozyme in growing plant tissue cultured in vitro. Z. Pflanzenphysiol. 111(5):91-94.
90. Pontali, M., 1985. La coltivazione del lampone in collina. Rivista di Frutticoltura 617:65-67.
91. Futz, C., 1971. Obtention de framboisiers sans virus par la technique des cultures de meristems. Ann. Phytopat. 3:493-501.
92. Pyott, J. L. and R. H. Converse, 1981. In vitro propagation of heat-terated red raspbeerry. HortScience 16(3):308-309.
93. Rebour, H., 1970. Frutos Mediterráneos. Ediciones Muni-Prensa. Madrid, España.
94. Reuter, G., 1985. Principles and application of the micropropagation of ornamental plants. In: Advances in agricultural biotechnology - In vitro techniques propagation and long term storage.

95. Robert, M. L. y V. M. Loyola (Eds.), 1985. El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. CONACYT, México.
96. Rodríguez, A. J. y E. Avitia, 1984. El cultivo de la frambuesa roja. Colegio de Posgraduados. Chapingo, México.
97. Rzedowski, J. y G. Rzedowski, 1979. Flora fanerogámica del valle de México. Limusa, México.
98. Sánchez del Castillo, F. y R. E. Escalante, 1983. Hidroponía. Principios y Métodos de cultivo. Universidad Autónoma de Chapingo, México.
99. Sánchez, S. O., 1980. La flora del valle de México. Herrero, S.A., México. 6a. ed.
100. Sauer, A.; F. Walther and W. Preil, 1985. Different suitability for in vitro propagation of Rose cultivars. Gartenbauwissenschaft 50(3):133-138.
101. Shchelkunova, S. E. and Y. P. Popov, 1970. Production of virus free raspberry plants from cultures of isolated apex. Soviet Plant Physiol. 17:513-516.
102. Schneider, G. W. y C. C. Scarbourg, 1979. Cultivo de árboles frutales. Continental, México.
103. Shoemaker, J., 1978. Small fruit culture. The Avi Publishing Co. INC. U.S.A. 5th. ed.
104. Skirvin, R.M.; M. C. Chu and E. Gomez, 1981. In vitro propagation of thornless blackberries. HortScience 16(3):310-312.
105. Skirvin, R. M. and E. W. Hellman, 1984. Blackberry products and product regions. HortScience 19(2):15-17.
106. Slivinsky, J. A.; J. E. Preece and D. Myers Jr., 1984. In vitro micropropagation of thornless blackberries utilizing single node explants. The Plant Propagator 30(1):4-5.
107. Snir, I., 1986. Growing raspberries under subtropical conditions. Acta Horticulturae 183:183-190.
108. Snir, I., 1981. Micropropagation of red raspberries. Sci. Hort. 14:139-143.
109. Sobezykiewicz, D., 1984. Mass production of raspberry plantlets through micropropagation and rooting

them directly in sand-peat mixture. Fruit Science Reports XI(2):73-77.

110. Standley, P. C., 1920 - 1926. Contributions from the United States National Herbarium. Trees and shrubs of Mexico. Vol. 23. Ed. J. Cramer, Germany.
111. Strickberger, M. W., 1982. Genetica. Omega, Barcelona. 2a. ed.
112. Styer, D. J. and C. K. Cnin. 1983. Meristem and shoot-tip culture for propagation, pathogen elimination and germoplasm preservation. Hort. Res. 5:221-227.
113. Swartz, H. J.; G. J. Galletta and R. H. Zimmerman, 1983. Field performance and phenotypic stability of tissue culture-propagated thornless blackberries. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108(2):285-290.
114. Tamaro, D., 1981. Tratado de fruticultura. Gustavo Gili, S.A. Barcelona, España. 4a. ed.
115. Torre, L. C. and B. H. Barrit, 1979. Red raspberry establishment from root cuttings. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 104(2):28-31.
116. Vince, D. y R. H. Stoughton, 1967. La luz artificial en la experimentacion con plantas. En: Control del medio ambiente de la planta. Hudson, J.F. (Ed.). Omega, Barcelona: 102-115.
117. Wardle, K.; E. D. Dobbs and K. C. Short, 1987. In vitro acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108(3):386-389.
118. Wellander, M., 1985. In vitro culture of raspberry (Rubus idaeus) for mass propagation. J. Hort. Sci. 60(4):493-499.
119. Wellensiek, S. J., 1967. Efectos del medio ambiente sobre las plantas. En: Control del medio ambiente de la planta. Hudson, J.F. (Ed.). Omega, Barcelona: 19-34.
120. Yeoman, M. M. and A. J. Macleod, 1977. Tissue (callus) cultures-techniques. In: Plant Tissue and Cell Culture. Street, H. E. (Ed.). Cal. Press, U.S.A.:137-176.
121. Zimmerman, R. H.; G. J. Galletta and O. C. Broome, 1980. Propagation of thornless blackberries by one-node cuttings. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105(3):404-405.