UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

TESIS DE GRADO

EFECTO DE REGULADORES DE CRECIMIENTO, *L*-CISTEÍNA Y ÁCIDO ASCÓRBICO EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus* Benth)

AUTORES

BRA. ILEANA FABIOLA MUÑOZ QUIJANO
BRA. HEIDY JOSÉ REYES SANDINO

ASESOR

ING. AGRO. MSC. JOSÉ DOLORES CISNE CONTRERAS

Tesis de grado para optar al titulo de Ingeniero Agrónomo Generalista

MANAGUA, NICARAGUA

2006

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

TESIS DE GRADO

EFECTO DE REGULADORES DE CRECIMIENTO, *L*-CISTEÍNA Y ÁCIDO ASCÓRBICO EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus* Benth)

AUTORES

BRA. ILEANA FABIOLA MUÑOZ QUIJANO
BRA. HEIDY JOSÉ REYES SANDINO

ASESOR

ING. AGRO. MSC. JOSÉ DOLORES CISNE CONTRERAS

MANAGUA, NICARAGUA

2006

ÍNDICE GENERAL

Contenido **Página**

Índice de tablas……i

Índice de figuras……...ii

Dedicatoria…….....iii

Agradecimiento……....v

RESUMEN……..vii

I.-INTRODUCCIÓN 1

II.- MATERIALES Y MÉTODOS.....4

2.1- Descripción del estudio 4

2.2- Esterilización de materiales y equipo..... 4

2.3- Obtención y preparación del material vegetativo..... 5

2.4- Fase I: Micropropagación de vitroplantas de mora de castilla..... 5

2.4.1- Preparación del medio basal (MS) 5

2.4.2- Establecimiento de los explantes 7

2.4.3- Efecto del BAP y el ácido giberélico 7

2.4.4- Efecto del ácido ascórbico..... 8

2.4.5 -Efecto de la *L*-cisteína..... 9

2.4.6- Diseño experimental y análisis estadistico..... 9

2.4.7- Variables evaluadas..... 9

2.5- Fase II: Enraizamiento de vitroplantas de mora de castilla..... 10

2.5.1- Preparación del medio de cultivo..... 10

2.5.2- Efecto del ácido indolacético 11

2.5.3- Efecto del ácido indolacético en medios de cultivo semisólido y líquido ... 11

2.5.4- Efecto del ácido indolacético, ácido indolbutírico y ácido naftalenacético . 12

2.5.5- Diseño experimental y análisis estadistico..... 12

2.5.6- Variables evaluadas..... 12

III.-RESULTADOS.....13
3.1- Efecto de 6-bencilaminopurina y ácido giberélico; ácido ascórbico y *L*-císteina en la fase de micropropagación *in vitro* del cultivo de mora de castilla.....13
3.1.1- Efecto de 6-bencilaminopurina y ácido giberélico..... 13
3.1.2 - Efecto del ácido ascórbico..... 14
3.1.3- Efecto de *L*-cisteína..... 15
3.2- Efecto del ácido indolacético, ácido indolbutírico y ácido naftalenacético y la consistencia del medio sobre el enraizamiento de vitroplantas de mora de castilla……...16
3.2.1- Efecto del ácido indolacético 16
3.2.2- Efecto del ácido indolacético en medio semisólido y líquido..... 17
3.2.3- Efecto del ácido indolacético, ácido indolbutirico y ácido naftalenacético. 18
IV.- DISCUSIÓN 19
4.1- Efecto de 6-bencilaminopurina y ácido giberélico; ácido ascórbico y *L*-cisteína en la fase de micropropagación *in vitro* del cultivo de mora de castilla……..….19
4.2- Efecto del ácido indolacético, ácido indolbutírico, ácido naftalenacético y la consistencia del medio sobre el enraizamiento de mora de castilla……..….21
V.- CONCLUSIONES 23
VI.- RECOMENDACIONES.....24
VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 25

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA **Página**

1: Soluciones madres concentradas de las sales nutritivas y vitamina B_{12} utilizada por el laboratorio de Cultivo de Tejido de la Universidad Nacional Agraria para la elaboración de los medios de cultivos. 6

2: Alícuotas utilizadas para elaborar el medio de cultivo MS modificado, en la fase de micropropagación del cultivo *in vitro* de mora de castilla 6

3: Niveles de citoquínina y ácido giberélico evaluados en el cultivo *in vitro* de mora de castilla. 8

4: Concentraciones de ácido ascórbico evaluados en el cultivo *in vitro* de mora de castilla. 8

5: Concentraciones de *L*-cisteína evaluados en el cultivo *in vitro* de mora de castilla. 9

6: Componentes nutritivos del medio de cultivo de enraizamiento para el cultivo *in vitro* de mora de castilla, elaborado a partir de las soluciones concentrada que se presentaron en la Tabla 1. 10

7: Concentraciones de AIA evaluados en el cultivo *in vitro* de mora de castilla. 11

8: Concentraciones de AIA en medio semisólido y líquido evaluados en el cultivo *in vitro* de mora de castilla. 11

9: Concentraciones de AIA, IBA y ANA evaluados en el cultivo *in vitro* de mora de castilla. 12

INDICE DE FIGURAS

FIGURA **Página**

1. Efecto de 6-bencilaminopurina y ácido giberélico sobre longitud de tallo, número de hojas, número de nudos y número de hijos en vitroplantas de mora de castilla a las 6 semanas de su inoculación. 13

2. Efecto de ácido ascórbico en diferentes concentraciones sobre longitud del tallo, número de hojas, número de nudos y número de hijos de vitroplantas de mora de castilla a las 6 semanas de su inoculación. 14

3. Efecto de *L*-cisteína en diferentes concentraciones sobre longitud del tallo, número de hojas, número de nudos y número de hijos de vitroplantas de mora de castilla a las 6 semanas de su inoculación..... 15

4. Efecto del ácido indolacético en diferentes concentraciones sobre longitud del tallo del tallo y formación de raíces en el cultivo *in vitro* de mora de castilla a las 6 semanas de su inoculación..... 16

5. Efecto del ácido indolacético en diferentes concentraciones en medio semisólido y líquido sobre la formación de raíces en el cultivo *in vitro* de mora de castilla a las 6 semanas de su inoculación..... 17

6. Efecto del ácido indolacético, ácido indolbutírico y ácido naftalenacético sobre la formación de raíces en el cultivo *in vitro* de mora de castilla a las 6 semanas de su inoculación……. 18

DEDICATORIA

A Yavé y a nuestro señor Jesús por darme vida y fuerza para lograr todas mis metas.

Con mucho amor a mis queridos padres Miguel Ángel Muñoz Nicaragua y Rosa Argentina Quijano de Muñoz por que este trabajo es el resultado del gran esfuerzo y amor que me han entregado.

A mi hermosa y preciosa hija Joysi Fabiana Tinoco Muñoz por que es quien da vida a mis pasos.

A mis hermanas Valeria de los Ángeles Muñoz Quijano, Ana Gabriela Muñoz Quijano y Karen Michelle Muñoz Quijano por su gran apoyo y amor.

A mi esposo José Norberto Tinoco Paniagua por su valioso apoyo y a todas aquellas personas que se sienten orgullosos de mis triunfos.

Ileana Fabiola Muñoz Quijano

DEDICATORIA

A Dios que me ha brindado la sabiduría, paciencia y fuerza de voluntad a lo largo de mi vida.

A mi padres Ariel Téllez y Cándida Rosa Sandino por estar siempre a mi lado brindándome siempre su apoyo, confianza y motivación para la realización de este trabajo investigativo.

A mi hija Betania Sinaí Pérez Reyes por ser la inspiración y el motor de mi existencia.

A mi esposo por su paciencia, comprensión y apoyo brindado a lo largo de mis estudios Universitarios.

A mis hermanos y hermanas por brindarme lo medios adecuados para alcanzar esta meta.

A todas la personas que estuvieron a mi lado, ansiosas y pendientes a que la finalización de este documento fuera todo un éxito a como lo es.

Heidy José Reyes Sandino

AGRADECIMIENTO

A Yavé por permitirme vivir y disfrutar mis triunfos alrededor de las personas que amo.

Al Ing. Agr. MSc. José Dolores Cisne Contreras por su valiosa guía y respaldo en mi trabajo. Además de ser un gran amigo.

A la Fundación para el Desarrollo Tecnológico Agropecuario y Forestal de Nicaragua (FUNICA), por haber brindado el apoyo financiero para la realización de este trabajo.

A todo el personal del Programa de Recursos Genéticos Nicaragüense por la disponibilidad de tiempo y apoyo humano.

A todos los trabajadores de la biblioteca por la atención brindada en este estudio en especial a Gabriel por brindarme toda la información que necesite.

A todos mis amigos que colaboraron de forma directa o indirecta en la realización de este estudio.

Ileana Fabiola Muñoz Quijano

AGRADECIMIENTO

A Dios que gracias a él fue posible la ejecución y realización de este trabajo investigativo.

Al Ing. Agr. MSc. José Dolores Cisne Contreras por la confianza, dedicación y esmero en la conducción de este trabajo. Por ser más que un profesor un amigo.

A todo el personal del programa de Recursos Genéticos Nicaragüenses, muy especial al Ing. Agr. Marbell Aguilar que siempre estuvo dispuesto a compartir sus conocimientos.

A todos los trabajadores de CENIDA muy especial a Gabriel López por estar siempre dispuesto a brindarme todo el material bibliográfico que necesite.

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron con este trabajo investigativo.

Heidy José Reyes Sandino

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo central contribuir al desarrollo de tecnología para la propagación *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth). Para ello se adaptó las técnicas de propagación *in vitro* desarrolladas por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia y se introdujo la variedad Rizaralda, cultivar de alto rendimiento y calidad, utilizada por productores de mora de castilla en la zona andina colombiana.

Los ensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Programa Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN), Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria. El material experimental provino de *vitro*plantas de mora de castilla, facilitadas por la Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

El estudio se desarrolló en dos fases. En la primera se ejecutaron evaluaciones sobre tres componentes del medio de cultivo de multiplicación acelerada. Para ello se realizaron tres ensayos experimentales: efecto del regulador de crecimiento 6-bencilaminopurina (BAP) en combinación de ácido giberélico (GA_3), efecto del ácido ascórbico y efecto de la *L*-cisteína sobre vitroplantas de mora de castilla. En la segunda fase se indujo el enraizamiento de vitroplantas obtenidas en la fase I.

En las evaluaciones realizadas en esta fase se establecieron de igual forma tres ensayos: inducción de raíces con el regulador de crecimiento ácido indolacético (AIA), efecto del AIA y consistencia del medio de cultivo sobre la formación de raíces y efecto del AIA, ácido indolbutírico (IBA) y ácido naftalenacético (ANA) en la formación de raíces.Utilizando para ambas fases las sales minerales de Murashige y Skoog (1962), suplementadas con tiamina 0.4 mg/l, mio-inositol 100 mg/l, sacarosa 30 g/l, Gelrite 3 g/l y ajustando el pH a 6. Los explantes se incubaron bajo condiciones de 18 °C, 16 horas luz y 4000 lux.

Según los resultados se estableció que el mejor tratamiento para la multiplicación acelerada de vitroplanta de mora de castilla fue 6-bencilaminopurina con 2.5 mg/l + 0.03 mg/l GA_3, obteniéndose una mayor producción de hijos, con un promedio de 3.13. En cuanto a la *L*-cisteína y ácido ascórbico no se establecieron influencia significativa entre tratamientos. En la segunda fase se estableció que el mejor tratamiento con 100 % de plantas enraizadas y 6.98 raíces por planta fue 1 mg/l de IBA, contrario al AIA que produjo menos del 50 % de plantas enraizadas. Por otra parte la consistencia del medio de cultivo no tuvo ninguna influencia en la producción de raíces.

I.-INTRODUCCIÓN

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) pertenece a la familia *Rosaceae*. Es originaria del trópico americano. Se cultiva principalmente en Ecuador, Colombia, Panamá, El Salvador, México y Estados Unidos (Devlin, 1982). Este cultivo puede ser comercializado para diferentes usos en la industria de alimentos, tales como la preparación de helados, edulcorantes, compota casera, jugos, yogurt y mermeladas. También puede ser comercializada como fruta fresca (Franco y Giraldo, 1999).

El cultivo de mora de castilla es una alternativa con un alto potencial económico para los productores de las zonas cafetaleras altas de Nicaragua. Hace veinte años, agricultores de hortalizas y café en el norte del país (Las Sabanas, municipio de Madriz, Ocotal, Jinotega y Matagalpa), incursionaron en la producción de mora de castilla. Les fue bien en los primeros años, pero posteriormente empezaron a tener problemas y prácticamente perdieron el mercado. Aparentemente este fracaso, se debió a la poca disponibilidad de materiales genéticos, a la falta de estudios en cuanto a la definición de las zonas agro ecológicas aptas para esta especie, así como de tecnología en determinados eslabones de la cadena agroalimentaria y de incentivos económicos (Sánchez , 2004).

Productores de mora de castilla de Las Sabanas, técnicos de Auxilio Mundial e INPRHU del departamento de Madriz reportan que el cultivo de mora de castilla se reinició nuevamente en el norte del país, aproximadamente hace dos años. Las principales áreas cultivadas se encuentran ubicadas en el departamento de Madriz, Municipio de Las Sabanas. En la actualidad solo se ha estado cultivando la variedad Brazo, que fue introducida de Guatemala. La variedad Brazo es un material genético que fue seleccionado en Estados Unidos. Es una variedad de tamaño intermedio, agridulce que se adapta con buenos resultados en alturas de 1400 a 1600 metros sobre el nivel del mar, pero que es muy afectada por plagas y enfermedades del follaje, flores y raíz.

Ante esta situación los agricultores y técnicos de las zonas productoras de mora de castilla plantearon la necesidad de introducir nuevos materiales genéticos, evaluarlos en campo y a la vez adoptar tecnologías agronómicas amigables con el medio ambiente, para reducir los costos de producción e incrementar la calidad y los rendimientos del cultivo. También señalaron la necesidad de estudiar aspectos del manejo de la cosecha y post-cosecha de la fruta (Sánchez, 2004).

Por tal razón se presentó la fuerte demanda de germoplasma del cultivo de mora de castilla, implementando la técnica de cultivo de tejido vegetales como método para la introducción y propagación acelerada de variedades de alta calidad y altos rendimientos. En este sentido la Universidad Nacional Agraria, con el auspicio financiero del FAITAN y con la colaboración de la Universidad Tecnológica de Pereira iniciaron la introducción de material genéticos de mora de castilla oriundos de Colombia, con el fin de ampliar la disponibilidad de materiales a los agricultores.

El crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinada por una serie de factores como: constitución genética de la planta, nutrientes (macro y micro elementos y azúcares), factores físicos (luz, temperatura y humedad relativa) que influyen sobre el crecimiento y sustancias orgánica (reguladores, vitaminas, etc.) (Pierik, 1990). Una vez definido el objetivo perseguido con el cultivo *in vitro* de un determinado explante es necesario elegir un medio apropiado de cultivo en el cual hay que considerar no solo sus componentes sino su preparación. Adicionalmente la elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos, en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada (Roca y Mroginski, 1991).

El segundo paso lo constituyen los minerales, muy importante dentro de las sustancias nutritivas en el cultivo *in vitro*. La mezcla de macrosales y microsales que se debe elegir, depende mucho de la planta con la que se trabaja. El medio Murashige y Skoog (1962), se utiliza mucho por que la mayor parte de las plantas reaccionan en él de forma positiva (Pierik, 1990).

En la actualidad la propagación *in vitro* se práctica con éxito en especies hortícolas, ornamentales y más recientemente en especies leñosas. En algunas especies, ésta metodología ha demostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación (Villalobos y Thorpe, 1991); las más importantes son incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo, reducción del tiempo de multiplicación, posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida a bajo costos y en términos económicamente costeables, mayor control sobre la sanidad del material que se propaga, facilidad para trasportar el material *in vitro* de un país a otro con menos restricciones aduaneras, posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual existan pocos individuos.

De manera que el cultivo de tejido permitió introducir el material de mora de castilla, disminuyendo la posibilidad de introducir insectos, bacterias, hongos o nemátodos, que pueden ser plaga o enfermedad de la mora de castilla o de otros cultivos de importancia económica. También hace posible que a partir de unas cuantas plantas se masifique rápidamente material de interés para los agricultores.

Considerando la importancia de la técnica de micropropagación del cultivo de mora de castilla para la agricultura de zonas altas de Nicaragua, fue que se propuso como objetivo general, el contribuir al desarrollo de tecnología para la propagación *in vitro* de mora de castilla y a la vez alcanzar los objetivos específicos de: evaluación del efecto de 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (GA_3), ácido ascórbico y *L*-cisteína sobre el comportamiento *in vitro* del cultivo de mora de castilla en la micropropagación y evaluar el efecto del ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (IBA) y ácido naftalenacético (ANA) y consistencia del medio sobre el enraizamiento *in vitro* de mora de castilla.

II.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1- Descripción del estudio

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Programa de Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN), Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria (UNA). Ubicada en el km 12 ½ Carretera Norte, departamento de Managua; en el período comprendido entre los meses de Agosto 2004 a Abril del 2005.

El estudio se desarrolló en dos fases. En la primera fase se ejecutaron evaluaciones de componentes del medio de cultivo de micropropagacion, mediante el comportamiento de las vitroplantas de mora de castilla. En la segunda fase se indujo el enraizamiento de vitroplantas por un período de 6 semanas.

2.2- Esterilización de materiales y equipo

Para el establecimiento de los ensayos en las dos fases de estudio los materiales utilizados en la siembra de los explantes y equipos de disección fueron previamente desinfectados y esterilizados. En cuanto la cristalería se realizó primeramente una limpieza de los frascos gerber y los tubos de ensayo, lavándolos con detergente y enjuagándolos con abundante agua, luego se sumergieron en cloro comercial (1 %) durante 24 horas. Los platos petri, pinzas y escarpelos se esterilizaron en horno a 180 ºC durante 40 minutos.

La cámara de flujo laminar en la que se realizó la multiplicación *in vitro* del cultivo de mora de castilla fue limpiada con alcohol (75 %) y se esterilizó con luz ultravioleta durante 45 minutos antes de proceder con la inoculación de los explantes. Para garantizar la no contaminación de los explantes o medios de cultivo durante la siembra los instrumentos de disección se esterilizaban por inmersión en alcohol (90 %) y exposición de los mismos a la flama de un mechero de gas por 30 segundos.

2.3- Obtención y preparación del material vegetativo

El material vegetativo utilizado fue tomado de plantas ya establecidas *in vitro*, de la variedad Rizaralda, provenientes de la Unidad de Biotecnología, Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Universidad Tecnológica de Pereira (UTP), Colombia. Las vitroplantas de mora de castilla en la fase de establecimiento se conservaron en un fitotrón del Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria bajo condiciones de 18 °C, 16 horas de fotoperíodo y 4000 lux.

2.4- Fase I: Micropropagación de vitroplantas de mora de castilla

En esta primera fase se llevaron a cabo 3 ensayos. Evaluándose el efecto de: 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico; ácido ascórbico y *L*-cisteína sobre el comportamiento *in vitro* de vitroplantas de mora de castilla en la fase de micropropagación.

2.4.1- Preparación del medio basal (MS)

Primeramente se lavó y secó la cristalería, y luego se elaboraron los medios con las sales minerales de Murashige y Skoog (1962), descrita en la Tabla 1; suplementados con tiamina 0.4 mg/l, mio-inositol 100 mg/l., sacarosa 30 g/l, Gelrite 3 g/l y se ajustó el pH a 6. Con ayuda de pipetas se tomaron cada una de las soluciones madres que serían usadas en la preparación del medio básico, se diluyeron en beakers con agua destilada y desionizada, con ayuda de probeta se agregó el total de agua destilada necesaria para completar la cantidad de medio a preparar. Se agrego la cantidad de sacarosa necesaria y se disolvió con un agitador magnético, la solución se calentó para disolver fácilmente el agar, una vez disuelto se distribuyó inmediatamente 10 ml de solución en cada tubo de ensayo.

Tabla 1: Soluciones madres concentradas de las sales nutritivas y vitamina B_{12} utilizada por el laboratorio de Cultivo de Tejido de la Universidad Nacional Agraria para la elaboración de los medios de cultivos.

FORMULA QUIMICA	NOMBRE	g/l
MACROSALES:		
NH_4NO_3	Nitrato de amonio	1650
KNO_3	Nitrato de potasio	1900
$MgSO_47H_2O$	Sulfato de magnesio heptahidratado	370
KH_2PO_4	Fosfato monobásico de potasio	170
CLORURO DE CALCIO:		
$CaCl_22H_2O$	Cloruro de calcio dihidratado	440
YODURO DE POTASIO:		
KI	Yoduro de potasio	0.83
MICROSALES:		
H_3BO_3	Ácido bórico	6.3
$MnSO_44H_2O$	Sulfato de manganeso tetrahidratado	16.9
$ZnSO_47H_2O$	Sulfato de zinc heptahidratado	8.6
$Na_2MoO_42H_2O$	Molibdato de sodio dihidratado	0.25
$CuSO_45H_2O$	Sulfato de cobre penta hidratado	0.025
$CoCl6H_2O$	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
EDTA-FE:		
EDTA	Ácido etilenaminotetraacético	37.3
$FeSO_47H_2O$	Sulfato de hierro heptahidratado	27.8
Tiamina HCl	Vitamina B_{12}	0.1

FUENTE: Murashige y Skoog; 1962

Además de los ingredientes que componen el medio basal, se adicionaron los constituyentes que se observan en la Tabla 2.

Tabla 2: Alícuotas utilizadas para elaborar el medio de cultivo MS modificado en la fase de micropropagación del cultivo *in vitro* de mora de castilla.

SOLUCION	CANTIDAD	STOCK
Macro sales	20 ml	1/50
Micro sales	1 ml	1/1000
Yoduro de potasio	1 ml	1/1000
EDTA-FE	10 ml	1/100
Cloruro de calcio	5 ml	1/200
Mio-inositol	1 ml	50 g/l
Tiamina	1 ml	200 mg/l
6-BAP	*	100 mg/l
GA_3	*	1 mg/l
Sacarosa	30 g	
Gelrite	3 g	
pH	6	

*: Las alícuotas se tomaron en base a las concentraciones utilizadas en cada uno de los ensayos.

2.4.2- Establecimiento de los explantes

Para establecer la siembra se realizó la desinfección de la cámara de flujo con alcohol al 75%, se colocaron en la cámara de siembra todos los instrumentos a utilizar (vasos gerber, platos petri, bisturí y pinzas esterilizados previamente), se encendió la luz ultra violeta por 30 minutos. Se sacaron los tubos de la autoclave, se trasladaron al cuarto de siembra donde se asperjaron con alcohol junto con las vitroplantas de mora de castilla. Posteriormente se realizó la siembra que consistió en las siguientes actividades: flamear las pinzas, bisturí y platos petri en el mechero así como los vasos con las plantas y los tubos de ensayo, se sacaron las plantas con las pinzas al plato petrí y se eliminaron con el bisturí hojas secas y parte basal necrótica. Se cortaron las vitroplantas en trozos de 1-2 cm de largo para colocarlos en los tubos de ensayo que contenían el medio nutritivo, se sellaron los tubos con cinta de parafina; se depositaron en gradillas; se tomaron los registros de identificación y se trasladaron a un cuarto de crecimiento bajo condiciones de 18 °C, 16 horas de fotoperíodo y 4000 lux. En este lugar las vitroplantas permanecieron durante 6 semanas consecutivas en condiciones ambientales controladas.

2.4.3- Efecto del BAP y el ácido giberélico

En este ensayo se estudió el efecto del BAP y ácido giberélico en diferentes concentraciones como se muestra en la Tabla 3, con el objetivo de estimular la formación de brotes laterales que pudieran ser utilizados como vitroplantas para la fase de enraizamiento o para pases sucesivos de proliferación de las vitroplantas. Para el establecimiento de los vitroplantas se utilizaron las sales minerales de Murashige y Skoog (1962) y los suplementos orgánicos que se presentan en la Tabla 2. Una vez sembrados las vitroplantas en los medios de cultivo (1 vitroplanta por tubo de ensayo) se trasladaron a una cámara climatizada (fitotrón) bajo las siguientes condiciones: 18 °C, 16 horas de fotoperíodo y 4000 lux.

Tabla 3. Niveles de citoquínina y ácido giberélico evaluados en el cultivo *in vitro* de mora de castilla.

Tratamiento	Concentraciones hormonales (mg/l)	
	BAP	**GA_3**
I	**0.5**	**0.00**
II	**0.5**	**0.01**
III	**1.0**	**0.00**
IV	**1.0**	**0.01**
V	**2.0**	**0.00**
VI	**2.5**	**0.03**

2.4.4- Efecto del ácido ascórbico

Para este ensayo se evaluó el efecto de 3 concentraciones de ácido ascórbico que se muestra en la Tabla 4 con el objetivo de estimular la formación de brotes laterales que puedan ser utilizados como vitroplantas para la fase de enraizamiento o para pases sucesivos de proliferación de las vitroplantas. Estas se cultivaron en un medio Murashige y Skoog (1962), suplementado con compuestos orgánicos y hormonas de crecimiento descritas en la Tabla 2, depositando una vitroplanta por tubo de ensayo.

Tabla 4. Concentraciones de ácido ascórbico evaluados en el cultivo *in vitro* de mora de castilla.

Tratamiento	Ácido ascórbico mg/l
I	**0.00**
II	**50.0**
III	**100.0**
IV	**150.0**

2.4.5 -Efecto de la *L*-cisteína

En este ensayo se evaluó el efecto de 3 concentraciones de *L*-cisteína que se muestra en la Tabla 5 con el objetivo de estimular la formación de brotes laterales que puedan ser utilizados como vitroplantas para la fase de enraizamiento o para pases sucesivos de proliferación de las vitroplantas de mora de castilla. Estas se cultivaron en un medio Murashige y Skoog (1962), suplementado con compuestos orgánicos y hormonas de crecimiento descrita en la Tabla 2, depositando una vitroplanta por tubo de ensayo.

Tabla 5. Concentraciones de *L*-cisteína evaluados en el cultivo *in vitro* de mora de castilla.

Tratamiento	***L*-cisteína mg/l**
I	**0.00**
II	**50.0**
III	**100.0**
VI	**150.0**

2.4.6- Diseño experimental y análisis estadístico

Se estableció un diseño completo al azar (DCA); con 10 repeticiones, colocando 1 vitroplanta en 10 ml de medio nutritivo semisólido en los tubos de ensayo. Aplicados los tratamientos y recopilados los datos, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), posteriormente se hizo una separación de medias de Tukey con un nivel de significancia de 5 % para determinar cuales de los tratamientos se reflejaban diferencias estadísticas significativas.

2.4.7- Variables evaluadas

La toma de datos se efectuó a las 6 semanas después de haber inoculado los explantes. Evaluando las siguientes variables:

a- Longitud del tallo: con una regla milimetrada se midió desde la base de la vitroplanta hasta el ápice del tallo.

b- Número de hijos: se contabilizó los brotes de la parte basal de la vitroplanta.

c- Número de hojas: se realizó de forma visual contabilizando las hojas bien formadas.

d- Número de nudos: se realizó de forma visual.

2.5- Fase II: Enraizamiento de vitroplantas de mora de castilla

En esta fase se realizaron 3 ensayos experimentales. Donde se evaluó el efecto del ácido indolacético, ácido indolbutírico (IBA) y ácido naftalenacético (ANA) y la consistencia del medio basal, en un período de 6 semanas de inoculación, en el cual el material vegetativo utilizado en esta fase fue tomado de plantas multiplicadas en la fase I.

2.5.1- Preparación del medio de cultivo

Primeramente se lavó y secó la cristalería y luego se elaboraron los medios con las sales minerales de Murashige y Skoog (1962), descrito en la Tabla 1, suplementando con tiamina 0.4 mg/l, mio-inositol 100 mg/l, cisteína 50 mg/l, ácido ascórbico 100 mg/l y sacarosa 40 g/l. Además de los ingredientes que componen el medio basal, se adicionaron los constituyentes que se observan en la Tabla 6.

Tabla 6. Componentes nutritivos del medio de cultivo de enraizamiento para el cultivo *in vitro* de mora de castilla, elaborado a partir de las soluciones concentrada que se presentaron en la Tabla 1.

SOLUCION	**VOLUMEN/PESO**	**STOCK**
Macro sales	20 ml	1/50
Micro sales	1 ml	1/1000
Yoduro de potasio	1 ml	1/1000
EDTA-FE	10 ml	1/100
Cloruro de calcio	5 ml	1/200
M-inosito	1 ml	50 g/l
Tiamina	1 ml	200 mg/l
AIA	*	100 mg/l
Acido ascórbico	0.1 g	
L-CISTEINA	0.1 g	
Sacarosa	40 g	
pH	6	

*: Las alícuotas se tomaron en base a las concentraciones utilizadas en cada uno de los ensayos.

2.5.2- Efecto del ácido indolacético

Para el establecimiento de este ensayo se utilizaron las sales de Murashige y Skoog (1962) y los suplementos orgánicos que se presentan en la Tabla 6, evaluándose 4 concentraciones de AIA para la formación de raíces, como se muestra en la Tabla 7, depositando 6 vitroplantas en cada vaso de gerber.

Tabla 7. Concentraciones de AIA (ácido indolacético) evaluados en el cultivo *in vitro* de mora de castilla.

Tratamiento	AIA (mg/l)
I	**0.5**
II	**1.0**
III	**1.5**
IV	**2.0**

2.5.3- Efecto del Ácido indolacético en medios de cultivo semisólido y líquido

En este ensayo se utilizaron las sales minerales de Murashige y Skoog (1962) y los suplementos orgánicos que se presentan en la Tabla 6, donde se evaluaron dos concentraciones de ácido indolacético (AIA) en diferente consistencia del medio basal; semisólido y líquido como se muestra en la Tabla 8 para la obtención de raíces en vitroplantas de mora de castilla.

Tabla 8. Concentraciones de AIA en medio semisólido y líquido evaluados en el cultivo *in vitro* de mora de castilla.

Tratamiento	Concentraciones
I	**1.0 mg/l AIA Medio sólido**
II	**1.0 mg/l AIA Medio líquido**
III	**1.5 mg/l AIA Medio sólido**
IV	**1.5 mg/l AIA Medio líquido**

2.5.4- Efecto del ácido indolacético, ácido indolbutírico y ácido naftalenacético

Para este ensayo se utilizaron las sales minerales de Murashige y Skoog (1962) y los suplementos orgánicos que se presentan en la Tabla 6, donde se estudió el comportamiento del ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (IBA) y ácido naftalenacético (ANA) como se muestra en la Tabla 9, para la obtención de raíces en vitroplantas de mora de castilla.

Tabla 9. Concentraciones de AIA, IBA y ANA evaluados en el cultivo *in vitro* de mora de castilla.

Tratamiento	Concentraciones
I	**1.0 mg/l AIA**
II	**1.0 mg/l IBA**
III	**0.2 mg/l ANA**

2.5.5- Diseño experimental y análisis estadístico

Se estableció un diseño completo al azar (DCA); con 15 repeticiones, colocando 4-6 vitroplantas de mora de castilla sobre 20 ml de medio por cada vaso de gerber**.** Aplicados los tratamientos y recopilados los datos, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), posteriormente se hizo una separación de medias de Tukey con un nivel de significancia de 5% para determinar entre cuales de los tratamientos existía diferencia estadística significativa.

2.5.6- Variables evaluadas

a- Formación de raíz: se contabilizaron visualmente todas las raíces formadas a partir de la planta madre, excluyendo las raíces que pudieran desarrollarse a partir de los hijos.

b- Porcentaje de plantas enraizadas: se contabilizaron todas las plantas que presentaron al menos una raíz y dividiéndolo entre el total de plantas.

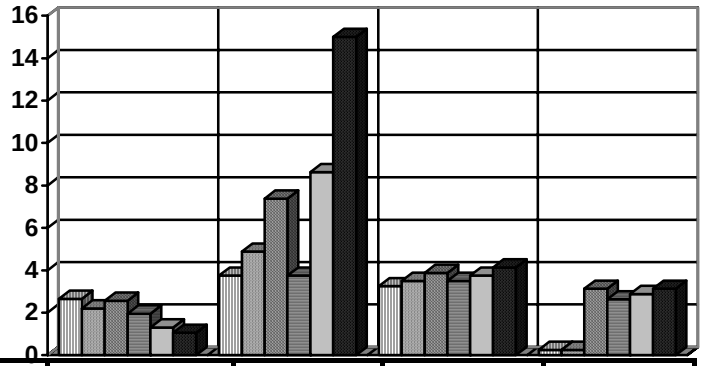
c- Longitud del tallo: con una regla milimetrada se midió desde la base hasta el ápice de la vitroplanta.

III.-RESULTADOS

3.1-Efecto de 6- bencilaminopurina y ácido giberélico; ácido ascórbico y *L*-cisteína en la fase de micropropagación *in vitro* del cultivo de mora de castilla

3.1.1- Efecto de 6- bencilaminopurina y ácido giberélico

En base al análisis estadístico realizado a los datos de la variable longitud de tallo se observó que las mayores alturas se alcanzaron en aquellos tratamientos en los que las concentraciones de BAP están por debajo de los 2 mg/l. Así se puede notar en la Figura 1 que la mayor longitud de tallo se presentó bajo el tratamiento 1 lográndose obtener plantas muy largas y débiles de coloración verde amarillento. Por el contrario, se observaron plantas más pequeñas a mayores concentraciones de dicha hormona, presentándose la menor longitud de tallo en concentraciones de 2.5 mg/l BAP en combinación con 0.03 mg/l GA_3. Se observó el mayor número de hojas en el tratamiento 6 y al realizar el análisis estadístico de las variables número de nudos no existe diferencia significativas en esta variable, pero se obtienen mayor número de nudos a niveles más altos; en número de hijos la mayor producción fue bajo el tratamiento 6, con plantas más vigorosas robustas y de coloración verde claro.

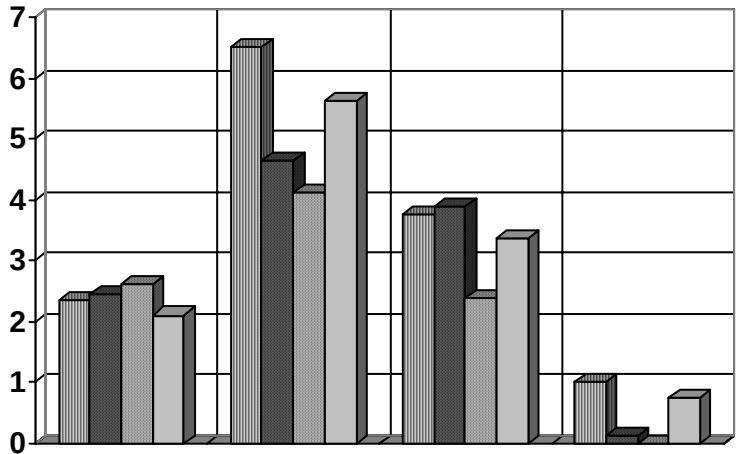


	N	Tratamiento (mg/l)	Long de tallo (cm)	Nº de hojas	Nº de nudos	Nº de hijos
	1	0.5 BAP+0.00 GA_3	**2.65 a**	3.75 b	3.25 a	0.25 b
	2	0.5 BAP+0.01 GA_3	2.20 a	4.88 b	3.50 a	0.25 b
	3	1.0 BAP+0.00 GA_3	2.56 a	7.38 b	3.88 a	3.13 a
	4	1.0 BAP+0.01 GA_3	1.96 ab	3.75 b	3.50 a	2.63 a
	5	2.0 BAP+0.00 GA_3	1.31 bc	8.63 b	3.75 a	2.88 a
	6	2.5 BAP+0.03 GA_3	**1.06 c**	**15 a**	4.13 a	**3.13 a**

Figura 1. Efecto de 6- bencilaminopurina y ácido giberélico sobre longitud de tallo, número de hojas, número de nudos y número de hijos en vitroplantas de mora de castilla a las 6 semanas de su inoculación.

3.1.2- Efecto del ácido ascórbico

A través del análisis estadístico realizado a las variables longitud del tallo, número de hojas, número de nudos y número de hijos demostró que no existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, sin embargo las mayores longitudes se alcanzaron a concertaciones de 100 mg/l de ácido ascórbico. En número de hojas, nudos e hijos fue mayor con 00 a 50 mg/l de ácido ascórbico como se muestra en la Figura 2. En este ensayo se obtuvieron plantas débiles y de coloración verde amarillo.

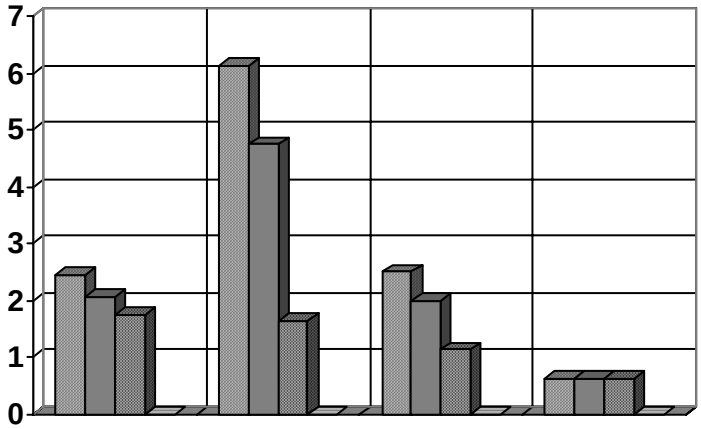


	N°	Tratamiento	Long del tallo (cm)	Nº de hojas	Nº de nudos	Nº de hijos
	1	100 mg/l Ácido ascórbico	2.63 a	4.13 a	2.38 a	0.00 a
	2	50.0 mg/l Ácido ascórbico	2.44 a	4.63 a	3.88 a	0.13 a
	3	0.00 mg/l Ácido ascórbico	2.33 a	6.50 a	3.75 a	1.00 a
	4	150 mg/l Ácido ascórbico	2.11 a	5.63 a	2.38 a	0.75 a

Figura 2. Efecto de ácido ascórbico en diferentes concentraciones sobre longitud del tallo, número de hojas, número de nudos y número de hijos de vitroplantas de mora de castilla a las 6 semanas de su inoculación.

3.1.3- Efecto de *L*- cisteína

El análisis realizado a la variable longitud del tallo reflejó que las mayores longitudes estuvieron influenciadas a concentraciones bajas de *L*-cisteína (tratamientos 1 y 2) y menores hasta 100 mg/l; respecto al número de hojas y número de nudos se puedo observar que las mayores fueron alcanzadas a concentraciones de 0.0 mg/l de *L*-cisteína, obteniéndose plantas débiles de poco grosor y de color verde pálido. En el análisis de la variable número de hijos no hubo diferencias significativas entre los tratamientos como se observa en la figura 3. Sin embargo concentraciones de 150 mg/l provocó la muerte de todas las vitroplantas.



	N°	Tratamiento	Long del tallo (cm)	Nº de hojas	Nº de nudo	Nº de hijos
	1	0.0 mg/l *L*-cisteína	**2.45 a**	**6.13 a**	**2.50 a**	0.63 a
	2	50 mg/l *L*-cisteína	2.06 ab	4.75 ab	2.00 ab	0.63 a
	3	100 mg/l *L*-cisteína	1.75 b	1.63 bc	1.13 bc	0.63 a
	4	150 mg/l *L*-cisteína	*	*	*	*

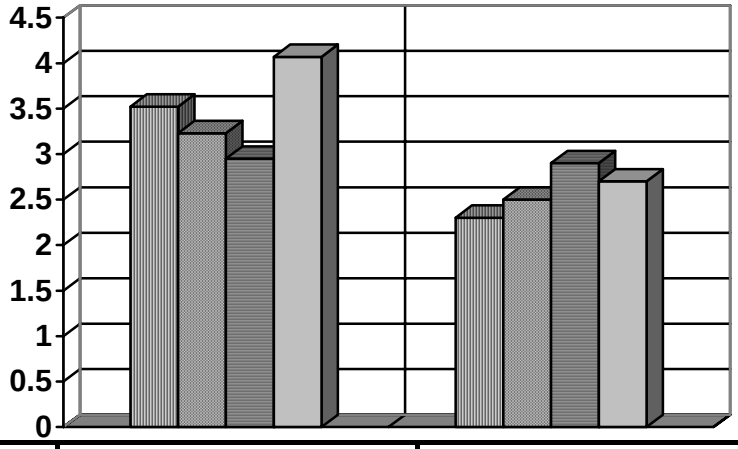
(*) = 100 % de las plantas no sobrevivieron.

Figura 3. Efecto de *L*-cisteína en diferentes concentraciones sobre longitud del tallo, número de hojas, número de nudos y número de hijos de vitroplantas de mora de castilla a las 6 semanas de su inoculación.

3.2- Efecto del ácido indolacético, ácido indolbutírico y ácido naftalenacético y la consistencia del medio sobre el enraizamiento de vitroplantas de mora de castilla

3.2.1- Efecto del ácido indolacético

De acuerdo al análisis de varianza realizado a los datos de la variable longitud del tallo se determinó que existieron diferencias significativas entre los tratamientos sometidos a los diferentes niveles de AIA demostrando que las mayores alturas alcanzadas se obtuvieron con concentraciones 2.0 mg/l AIA y plantas de menor tamaño a concentraciones de 1.5 mg/l AIA siendo éstas más verdes y robustas. El análisis realizado a la variable número de raíces por planta demostró que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos analizados, pero se observó una mayor producción de raíces bajo el tratamiento 1 como se indica en la Figura 4.

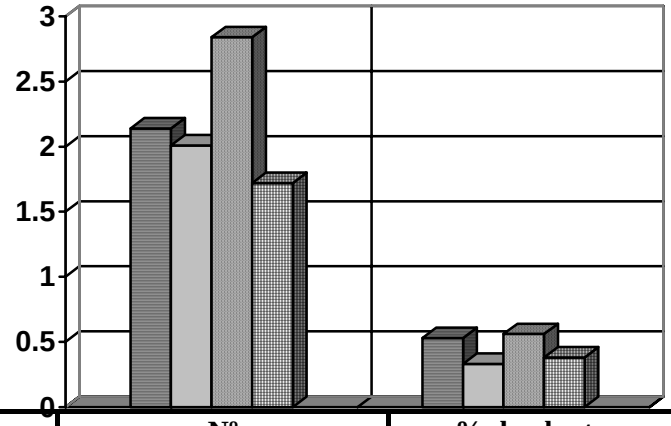


	N°	Tratamiento	Long del tallo (cm)	Nº de raíces/planta
	1	**2.0 mg/l AIA**	**4.07 a**	2.90 a
	2	**0.5 mg/l AIA**	3.52 ab	2.70 a
	3	**1.0 mg/l AIA**	3.23 ab	2.50 a
	4	**1.5 mg/l AIA**	**2.95 b**	2.03 a

Figura 4. Efecto del ácido indolacético en diferentes concentraciones sobre longitud del tallo y formación de raíces en el cultivo *in vitro* de mora de castilla las 6 semanas de su inoculación.

3.2.2- Efecto del ácido indolacético en medio semisólido y líquido

El análisis realizado bajo de la prueba de significancia de Tukey a la variable número de raíces por planta y porcentaje de plantas enraizadas demostró que no existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados en cuanto a los medios basales bajo estudio, sin embargo hubo mayor producción de raíces así como mayor cantidad de plantas que enraizaron a través del tratamiento 1, como se refleja en la Figura 5.

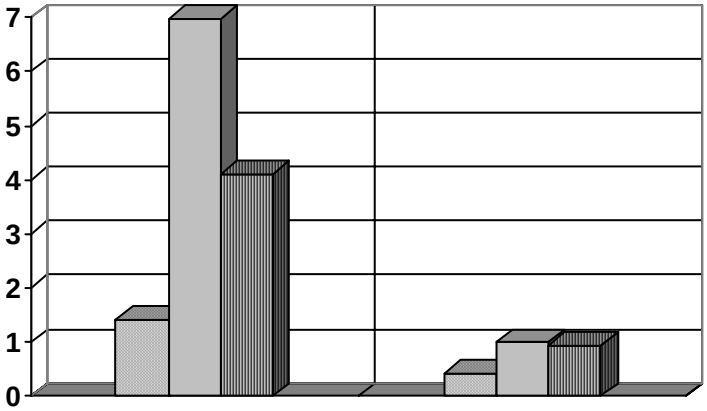


	N°	Tratamiento AIA (mg/l)	Nº raíces/planta	% de plantas enraizadas
	1	**1.5 Medio sólido**	2.84 a	0.56 a
	2	**1.0 Medio sólido**	2.14 a	0.53 a
	3	**1.0 Medio líquido**	2.01 a	0.33 a
	4	**1.5 Medio líquido**	1.72 a	0.38 a

Figura 5. Efecto del ácido indolacético en diferentes concentraciones en medio sólido y líquido sobre la formación de raíces en el cultivo *in vitro* de mora de castilla a las 6 semanas de su inoculación.

3.2.3- Efecto del ácido indolacético, ácido indolbutírico y ácido naftalenacético

Según el análisis de varianza realizado a la variable número de raíces por planta determinó que existe diferencias significativas entre los tratamiento demostrando que se produjo mayor cantidad de raíces por planta a concentraciones de 1.0 mg/l IBA y menores cantidades en el tratamiento 3. El análisis realizado a la variable porcentaje de plantas enraizadas demostraron que a concentraciones de 1.0 mg/l IBA hubieron más plantas enraizadas en comparación con los niveles de 0.2 mg/l ANA y 1.0 mg/l AIA como se refleja en la Figura 6.



	N°	Tratamiento	Nº raíces/planta	% plantas enraizadas
	1	**1.0 mg/l IBA**	**6.98 a**	**1.00 a**
	2	**0.2 mg/l ANA**	4.10 b	0.93 a
	3	**1.0 mg/l AIA**	**1.41 c**	**0.42 b**

Figura 6. Efecto del ácido indolacético, ácido indolbutírico y ácido naftalenacético sobre la formación de raíces en el cultivo *in vitro* de mora de castilla a las 6 semanas de su inoculación.

IV.- DISCUSIÓN

4.1- Efecto de 6-bencilaminopurina y ácido giberélico; ácido ascórbico y *L*-cisteína en la fase de micropropagación *in vitro* del cultivo de mora de castilla

En el cultivo de la mora de castilla la propagación sexual no se recomienda debido a la baja cantidad de semillas fértiles en cada fruto, el largo período de germinación y el lento desarrollo de las plántulas. Actualmente la propagación se realiza por la vía asexual, acodo y estaca; pero este medio presenta dificultades en la etapa de enraizamiento y brotes de las primeras hojas y ramas, ya que esta agota sus reservas y pierde vigor para continuar su desarrollo (Montoya y Uribe, 1997). En busca de ofrecer plantas de mora de castilla en cantidad suficiente y de buena calidad genética y fitosanitaria se debe realizar una propagación *in vitro*. Las técnicas del cultivo *in vitro* son un instrumento de gran importancia para propagar masivamente plantas de alta calidad, en condiciones controladas y pequeño espacio a diferencia del método convencional.

En la multiplicación *in vitro* las citoquíninas como componente importante en el medio de cultivo promueven la división celular, proliferación de yemas axilares y neoformacion de órganos *in vitro* (Azcon, 2000; García y Martínez, 1994; Saldivar, 1994). En el caso específico del cultivo de mora de castilla se evaluó la hormona sintética 6-bencil aminopurina (BAP); donde es una de las más utilizadas frecuentemente para estimular el crecimiento y desarrollo, división celular, alargamiento celular, iniciación y crecimiento de raíces (Rojas y Ramírez, 1991).

López y García (1991), propagaron *in vitro* cuatro variedades de frambuesa Raspberry en medio Anderson y evaluaron con 2,0 mg/l de BAP obteniendo buenos resultados en cuanto al número de yemas por explante que va desde 3,6 y 3,8. Una respuesta similar se obtuvo al evaluar 2.5 mg/l de BAP en el cultivo *in vitro* de mora de castilla con una producción promedio de 4.13 nudos y 3.13 hijos, básico en la propagación masiva de este cultivo, siendo estos los mejores resultados en la evaluación realizada en la fase de micropropagación, logrando obtener plantas de excelente porte.

La giberelina (GA_3) importante en el cultivo de tejidos vegetales ya que presenta un espectro de actividad biológica muy variado, con un papel regulatorio principal en el crecimiento, ya que este puede producir una elongación extraordinaria del tallo en enanos genéticos (Hurtado y Merino, 1994). Caso contrario a los resultados obtenidos en el cultivo de mora de castilla ya que las mayores alturas se establecieron a niveles sumamente bajos de GA_3 a diferencia de lo mencionado anteriormente. En la mayoría de los cultivos, los niveles de GA_3 superiores a 1.0 mg/l son tóxicos en este caso las giberelinas deberían utilizarse en bajos niveles (Van Braga y Pierik, 1971). En el cultivo de meristemas de mora de castilla, la utilización de GA_3 presentó mejores resultados a niveles de 0.03 mg/l en combinación de 2.5 mg/l de BAP, brindando una mayor producción de hojas e hijos básicos para la propagación masiva; aunque plantas de porte relativamente pequeñas.

Con respecto a la función del ácido ascórbico en la propagación masiva de plantas *in vitro* de mora de castilla este puede actuar en dos formas. Como un agente reductor que retrasa la formación de sustancias similares a la melanina, que inhiben el crecimiento, tal y como lo reportan (Arditti, 1966; Vacin y Went, 1949; Nitsch, 1954). También puede actuar como un estimulador del proceso de crecimiento, como lo reportan (Hurtado y Merino, 1994). Sin embargo y según el ensayo realizado en el presente trabajo el ácido ascórbico no tuvo ningún efecto estimulador sobre las variables evaluadas, aunque este pudo haber tenido cierto efecto sobre la inhibición de sustancia fenólicas.

Por otra parte, el utilizar aminoácidos en la nutrición de los tejidos y células vegetales cultivadas se debe considerar un problema complejo, ya que muchos tejidos responden diferentemente a los suplementos de aminoácidos (Roca y Mroginski, 1991). Aunque las proteínas de las plantas contienen cantidades bajas de aminoácidos sulfúricos como la cisteína y la metionina (Durzan y Steward, 1983), estos son necesarios para un crecimiento y desarrollo normal.

Se ha demostrado que la cisteína puede tener dos efectos completamente diferentes según la modalidad de esterilización (Nitsch y Nitsch, 1957); cuando se esteriliza con filtro, es inhibidor a nivel de 1-2 *u*mol, y cuando se usa la autoclave, aparentemente se descompone y actúa como una fuente de azufre. Probablemente en el caso de los explantes de mora de castilla cultivados en concentraciones mayores a los 100 mg/l, fue tóxica provocando la muerte de las plantas.

4.2- Efecto del ácido indolacético, ácido indolbutírico, ácido naftalenacético y la consistencia del medio en el enraizamiento de vitroplantas de mora de castilla

El éxito del cultivo de tejidos vegetales, en gran parte, depende del medio de cultivo empleado. En el caso concreto de la micropropagación es vital la definición de los medios de cultivos para cada una de las fases (establecimiento, propagación acelerada y enraizamiento). Para establecer un sistema de propagación *in vitro* de tejidos vegetales, se elabora primero un medio de cultivo óptimo que se ajuste a los principales requerimientos nutricionales de la especie vegetal, al tipo de explante y al sistema de cultivo. La efectividad de un medio de cultivo depende tanto de los ingredientes básicos (minerales). Así como de azúcares y hormonas (Romberger y Tabor, 1971; Bending, 1974; Lorz, Larking y Scow, 1983).

Para el éxito de la III fase de la micropropagación (enraizamiento) generalmente se utilizan las auxinas, las cuales por su origen pueden ser naturales o sintéticas. De las auxinas “naturales”, el ácido indolacético (AIA) es el compuesto de mayor utilización (Scout, 1984). Las auxinas se utilizan ampliamente en micropropagación y se incorporan al medio de cultivo para promover el desarrollo de callos, de suspensiones celulares, de órganos (como meristemas, yemas) y para regular la morfogénesis (Cisne, 1988). En la práctica, el uso de auxinas es un arte. No es posible establecer una concentración particular de auxina que se debe utilizar en un solo caso. Sin embargo, en general se utiliza el AIA en concentraciones que varían de 0.001 a 10 mg/l, con un punto óptimo alrededor de 0.1 a 1 mg/l (Roca y Mroginski, 1991).

Se sabe que las auxinas son un factor esencial en la proporción del crecimiento de las raíces, debido a que, en general, el AIA puede incrementar significativamente la elongación de segmentos aislados de raíces, tanto *in vitro* como *in vivo*, además de que incrementa su crecimiento. También es conocido que las raíces a las que se les ha inhibido el crecimiento por medio de la aplicación de inhibidores sintéticos o naturales pueden reanudarlo si se les aplica auxinas (Hurtado y Merino, 1994). Al establecer vitroplantas de mora de castilla bajo la influencia de AIA a concentraciones que van desde 0.5 a 2 mg/l, se observó una formación de raíces muy pobre y variable, a tal punto que en ninguno de los tratamientos en estudio se superó el 50 % de plantas enraizadas. Este comportamiento se reflejó de forma similar en los ensayos en donde se estudió el comportamiento del AIA a concentraciones de 1.5 y 1 mg/l, tanto en medio líquido como semisólido. En estos casos, siempre se mantuvieron los bajos porcentajes de formación de raíces y en ambos no hubo diferencias significativas entre tratamientos. A pesar de que en la literatura se reporta que el Gelrite, en el caso especifico del medio semisólido, mejora la eficiencia de enraizamiento en diversos sistemas de cultivos de tejidos vegetales (Roca y Mroginski, 1991).

En caso contrario al AIA, la utilización de hormonas sintéticas presentó una mayor producción de raíces en el cultivo de mora de castilla, donde el ácido naftalenacético (ANA) tuvo un 93 % de plantas enraizadas contrapuesto al AIA con un 43 %.

Castro y Gaviria (1995), realizaron estudios de enraizamiento en diferentes especies de *Rubus* bajo la aplicación de ácido indolbutírico **(**IBA) en diferentes concentraciones, donde se encontró que en concentraciones de IBA entre 1 y 3 mg/l indujo un porcentaje de enraizamiento del 100 %. Una respuesta similar a la anterior se obtuvo en el estudio con mora de castilla, cuando a las vitroplantas de mora de castilla se cultivaron en un medio nutritivo con 1.0 mg/l de IBA lográndose obtener exitosamente plantas con mayor número de raíces y con un 100 % de plantas enraizadas.

V.- CONCLUSIONES

1- La metodología de adoptar tecnología desarrollada por centros de investigación de universidades de la región Latino Americana, resultó ser todo un éxito. Por que aun en medio de tantas limitantes, con la capacitación recibida se logró cultivar en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la UNA la variedad Rizaralda de forma masiva.

2- La introducción de variedades de mora de castilla a través de cultivos *in vitro* es una forma rápida y segura. En la medida de lo posible se debe utilizar para introducir materiales de otras especies de interés económico para productores de Nicaragua.

3- Para propagar *in vitro* la mora de castilla es necesario que ésta crezca en condiciones de temperatura no mayores a los 20 °C. Temperaturas mayores a la indicada producen un deterioro de la vitroplanta y fenolización.

4- Los medios de cultivos a concentraciones de 2.5 mg/l BAP; 0.03 mg/l GA_3 indujeron los mejores resultados en las variables longitud de planta, número promedio de hojas, número promedio de nudos y número promedio de hijos produciendo plantas de mora de castilla más proliferas para una continua propagación *in vitro.*

5- Para lograr una mayor producción de raíces por planta y plantas enraizadas en el cultivo *in vitro* de mora de castilla se hace necesario la utilización de la hormona ácido indolbutírico a concentraciones de 1.0 mg/l.

6- La utilización de ácido ascórbico y *L*-cisteína no es determinante en la micropropagacion de mora de castilla; pero si es necesario su adición al medio de cultivo para la obtención de plantas de alta calidad fisiológica.

VI.- RECOMENDACIONES

1- Recomendamos para la multiplicación masiva de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) utilizar 6-bencilaminopurina (BAP), en concentraciones de 2.5 mg/l y ácido giberélico concentraciones de 0.03 mg/l.

2- Se recomienda la utilización de *L*-cisteína en bajas concentraciones menores o iguales de 100 mg/l, no se debe utilizar concentraciones mayores o iguales a los 150 mg/l.

3- Creemos que no es indispensable la utilización ácido ascórbico en la fase de multiplicación acelerada y enraizamiento, pero la adición de esta vitamina mejora el vigor de la planta.

4- Recomendamos en la fase de enraizamiento del cultivo *in vitro* de mora de castilla la utilización de ácido indolbutírico a concentraciones de 1.0 mg/l.

VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Arditti, J. 1966. The effect of tomato juice and ists frations on the germination of orchid seeds and on seedling growth. American Orchid Society Bulletin. 35 (3): 175-182.

Azcon, T A. 2000. Fundamento de fisiología vegetal. Universidad de Barcelona. España. 535 p.

Bending, H. 1974. Regeneration von haploiden und diploiden pflanzen aus potoplasten von Petunia hydrida. L. Z. Pflnzen physiol. 74: 327-356.

Castro, R. D. y Gaviria, G: B. 1995. Propagacion *in vitro* de especies del género Rubus Universidad Catolica de Orient. Fundacion de Fomento Agropecuario Buen Pastor. Serie: investigaciones-10. Colombia. 9p.

Cisne Contreras, J. D. 1988. Introducción a la técnica de cultivo de tejidos vegetales. Tesis Ing. Agr. Nicaragua, Universidad Nacional Agraria. 89 p.

Devlin, R. 1982. Fisiología vegetal. 4 ed. Omega SA. Barcelona. 517 p.

Durzan, D. J. y Steward, F. C. 1983. Nitrogen metabolism. En: Steward, F. C. y Bidwell, R. G. S. (eds). Plant physiology: Atretise. Academia Press, Nueva Cork. V. 8, P. 55-265

Hurtado, D. M y Merino, M. E. 1994. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas S.A. de C.V. México. 233 p.

Franco, G y Giraldo, M. 1999. El cultivo de la mora. 2 ed. Feriva Corpoica. Comité Departamental de Cafeteros de Rizalda. Colombia. 99 p.

García, F y Martínez, B. 1994. Introducción a la fisiología vegetal. Ediciones Mundi Prensa. España. 219 p.

López Baltasar, J. y Avitia García. 1991. In vitro propagation of tour raspberry (Rubus spp.) cultivars. Revista Chapingo 15. 155p.

Lorz, H.; Larking, P. J. y Scow croft, W. R. 1983. Improved protoplast culture and agarose media. Plant Cell Tissue Organ Culture. 2: 217-226.

Montoya C.A, Hincapié L.A., y Uribe, V. 1997. Principales enfermedades y plagas en el cultivo de la mora. Boletín Técnico, Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Unidad de Asistencia Técnica Agropecuaria (UMATA). Quinchía, pp. 8-19.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium, for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiology Plantarum. 497p.

Nitsch, J. P. 1954. Action du jus de tomato sur la croissance de certains tisssus et organs vegetaux. Bull. Soc. Bot. France. 101: 433-440.

Nistch, J. P. y Nitsch, C. 1957. Auxin dependent growth of excised Helianthus tuberosos tissues; 2: Organic nitrogenous compounds. Amer. J. Bot.44: 550-564.

Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Versión en español. Luís Ayerde. Mundi Prensa. Madrid. 326 p.

Reinert, J. y White, P. R. 1956. The cultivation *in vitro* of tumor tisúes and normal tisúes of Picea glauca. Physiol. Pant. 9: 177-189.

Roca, W. M., y Mroginski L. A. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali. Colombia. 170 p.

Rojas, G; M. y Ramírez, H. 1991. Control hormonal del desarrollo de las plantas, fisiología-tecnología-experimentación. 2ª. ed. México. Limusa. 56p.

Romberger, J. A. y Tabor, C: A. 1971. The Picea abis shoot apical meristem in culture: Aguar and autoclaving effects. Ame. J. Bot. 58: 131-140.

Saldivar L. H. R. 1994. Fisiología Vegetal. ed. 1. Universidad Autónoma Agraria, Antonio Navarro. Editorial Trillas. México. 23 p.

Sánchez, G. 2004. Tratan de salvar potencial de la mora. El Nuevo Diario, Managua, Nic, May. 19:9c.

Scout, T. K. (ed.) 1984. Hormonal regulation of development; 2: The funcion of hormones from the level of the all to the whole plant. Ency clopedia of plant physiology, new series. Springer-Verlas, Nueva Cork. V. 10.

Vacin, E. F: y Went, F. W. 1949. Use of tomato juice in the asymbiotic germination of orchid seeds. Botan. Gaz. 111: 175-183.

Van Braga, J. y Pierik, R. L. M. 1971ª. The effect of autoclaving on the gebberellin activity of aqueous solutions containing gibberellin A_3. Misc. Papers Landbouwhogeschool Wageningen. 9: 1-147.

Villalobos A. V. M. y Thorpe, T. A. 1991. Micropropagación: Conceptos, metodología y resultados en: Cultivo de tejidos vegetales en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. Por William M. Roca, y Luís Mroginski. CIAT. Cali, Col. P. 127-141.