

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

Efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina y ácido giberélico sobre el establecimiento *in vitro* de yemas de frambuesa (*Rubus idaeus*) variedad Heritage

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Bach. Milla Gonzáles, Rosa Danixa

Bach. Sánchez Panduro, Andy Ronal

ASESOR:

Mg. Avalos Ramírez, Yosef Javier

ID ORCID: 0000-0002-0071-8413

NUEVO CHIMBOTE – PERÚ

2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

Efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina y ácido giberélico sobre el establecimiento *in vitro* de yemas de frambuesa (*Rubus idaeus*) variedad Heritage

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

Revisado y Aprobado por el Asesor

Mg. Avalos Ramírez, Yosef Javier

DNI: 18127282

ID ORCID: 0000-0002-0071-8413

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

Efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina y ácido giberélico sobre el establecimiento *in vitro* de yemas de frambuesa (*Rubus idaeus*) variedad Heritage

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

Revisado y Aprobado por el Jurado Evaluador:

Ms. Villanueva Carlos, José Manuel

PRESIDENTE

DNI: 32733772

ID ORCID: 0000-0002-5056-0001

M. Sc. Alva Muñoz, Eterio Amaranto

SECRETARIO

DNI: 32406295

ID ORCID: 0000-0002-4113-7981

Mg. Avalos Ramírez, Yosef Javier

INTEGRANTE

DNI: 18127282

ID ORCID: 0000-0002-0071-8413

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en la reunión en el Aula Multimedia 3er piso de la Facultad de Ciencias de la UNS, dando cumplimiento a la Resolución N° 305-2024-UNS-CFC. siendo las 16:00 horas del día 18 octubre del 2024

se reunió el Jurado Evaluador presidido por el Ms José Manuel Villanueva Carlos, y teniendo como miembros a M Sc, Eterio Alva Muñoz (secretario) (a) y Mg. Yosef Avalos Ramírez (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA, realizado por él, (la), (los) tesista (as) Rosa Danixa MILLA GONZALES y Andy Ronal SANCHEZ PANDURO de la Escuela Profesional de Biotecnología .quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada:

“Efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina y ácido giberélico sobre el establecimiento in vitro de yemas de frambuesa (Rubus idaeus) variedad Heritage”

Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como **BUENO** asignándole un calificativo de Diecisiete (17) puntos. Según artículo 111° del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 580-2022-CU-R-UNS)

Siendo las 18:00 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad



Nombre: Ms José Villanueva Carlos
Presidente



Nombre: M Sc Eterio Alva Muñoz
Secretario



Nombre: Mg. Yosef Avalos Ramírez
Integrante

Distribución: Integrantes JE (03), tesistas () y archivo FC (02).



Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Jose Villanueva
Título del ejercicio: TESIS 2024
Título de la entrega: "Efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina...
Nombre del archivo: INFORME_TESIS_FINAL.pdf
Tamaño del archivo: 1.54M
Total páginas: 61
Total de palabras: 13,054
Total de caracteres: 66,632
Fecha de entrega: 06-nov.-2024 06:59a. m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega... 2413904895

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



Efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina y ácido giberélico sobre el establecimiento *in vitro* de yemas de frambuesa (*Rubus idaeus*) variedad Heritage

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Bach. Milla Gonzáles, Rosa Danixa
Bach. Sánchez Panduro, Andy Ronal

ASESOR:

Mg. Avalos Ramírez, Yosef Javier
ID ORCID: 0000-0002-0071-8413

NUEVO CHIMBOTE - PERÚ
2024

“Efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina y ácido giberélico sobre el establecimiento in vitro de yemas de frambuesa (Rubus idaeus) variedad Heritage

INFORME DE ORIGINALIDAD

19%

INDICE DE SIMILITUD

19%

FUENTES DE INTERNET

7%

PUBLICACIONES

6%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.uns.edu.pe	3%
	Fuente de Internet	
2	repositorio.unasam.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	
3	dspace.unitru.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	
4	repositorio.unc.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	
5	tesis.unsm.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	
6	up-rid.up.ac.pa	1%
	Fuente de Internet	
7	hdl.handle.net	1%
	Fuente de Internet	
8	repositorio.umsa.bo	1%
	Fuente de Internet	

DEDICATORIA

A nuestros padres y hermanos por el apoyo y guía durante nuestro desarrollo profesional y por su infinito amor que siempre nos brindan.

Estimados Lleri, Katherine, Angelo y Moisés, queremos que sepan que son un ejemplo de perseverancia y empeño y todo nuestro éxito será dedicado siempre a ustedes.

AGRADECIMIENTO

A Dios Todopoderoso en primer lugar por guiarnos en el camino correcto y darnos la fuerza en nuestros aciertos y errores, ya que con su bendición todo es posible.

Agradecemos infinitamente a nuestros padres y hermanos por ser el principal apoyo en nuestra etapa de aprendizaje profesional.

Nuestro más sincero agradecimiento a los profesores que asentaron las bases de nuestro desarrollo profesional con genuino interés y esmero en su labor de catedráticos.

Agradecemos completamente a nuestro asesor Mg. Yosef Javier Avalos Ramírez por su predisposición en todo momento en aportar y contribuir en la mejora de nuestra investigación.

Y a todas las personas que hicieron posible la presente investigación, nuestro más sincero agradecimiento.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	iv
Agradecimiento	v
Resumen	x
Abstract	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	3
1.2. Hipótesis.....	3
1.3. Justificación e importancia.....	4
II. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. Frambueso	5
2.2. Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.....	6
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1. Preparación del medio de cultivo	15
3.2. Recolección del material vegetal.....	15
3.3. Desinfección del material vegetal	16
3.4. Introducción <i>in vitro</i>	16
3.5. Evaluación biométrica.....	17
3.6. Diseño experimental.....	18
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1. Resultados	19
4.2. Discusión.....	30
V. CONCLUSIONES	35
VI. RECOMENDACIÓN.....	36
VII. REFERENCIAS	37
VIII. ANEXOS	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Diseño experimental, concentración de BAP y AG3.....	18
Tabla 2: Porcentaje de sobrevivencia de explantes a los 30 días por cada tratamiento....	19
Tabla 3: Análisis de varianza de dos factores del porcentaje de sobrevivencia a los 30 días por cada tratamiento.....	20
Tabla 4: Porcentaje de brotes obtenidos a los 30 días por cada tratamiento.....	21
Tabla 5: Análisis de varianza de dos factores del porcentaje de brotes obtenidos a los 30 días por cada tratamiento.....	21
Tabla 6: Número de hojas por explante de frambuesa in vitro obtenidos a los 30 días de siembra.....	22
Tabla 7: Análisis de varianza de dos factores del número de hojas por explante de frambuesa in vitro obtenidos a los 30 días de siembra.....	23
Tabla 8: Número de hojas por explante de frambuesa in vitro obtenidos a los 60 días de siembra.....	23
Tabla 9: Análisis de varianza de dos factores del número de hojas por explante a los 60 días por cada tratamiento.....	24
Tabla 10: Longitud del brote de frambuesa in vitro obtenidos a los 30 días de siembra..	24
Tabla 11: Análisis de varianza de dos factores de la longitud del brote de frambuesa a los 30 días por cada tratamiento.....	25
Tabla 12: Longitud del brote de frambuesa in vitro obtenidos a los 60 días de siembra..	26
Tabla 13: Análisis de varianza de dos factores de la longitud del brote de frambuesa a los 60 días por cada tratamiento.....	26
Tabla 14: Datos del modelo estadístico y datos experimentales de longitud de brote tras 60 días.....	27
Tabla 15: Datos del modelo estadístico y datos experimentales de longitud de brote tras 60 días.....	29
Tabla 16. Composición del medio de cultivo Murashigue y Skoog.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Etapas del Cultivo in vitro.....	7
Figura 2: Mecanismo de acción de las citoquininas en la célula vegetal.	11
Figura 3: Ruta de síntesis de ácido giberélico en plantas.	13
Figura 4: Mecanismo de acción de las giberelinas en plantas.	13
Figura 5: Reactivos para la preparación del medio de cultivo.....	15
Figura 6: Esquejes de frambuesa recolectados.....	15
Figura 7: Segmentos nodales preparados para la desinfección en cabina de flujo laminar.	16
Figura 8: Introducción in vitro de explantes de frambuesa. A. yema vista en el estereoscopio. B. yema después de la extracción de capas superficiales. C. yema introducida en el medio de cultivo.	17
Figura 9. Modelo estadístico para longitud de brote de <i>Rubus idaeus</i>	27
Figura 10. Comparación de los datos del modelo estadístico y datos experimentales de longitud de brote tras 60 días.....	28
Figura 11. Modelo estadístico para número de hojas de <i>Rubus idaeus</i>	28
Figura 12. Comparación de los datos del modelo estadístico y datos experimentales de número de hojas tras 60 días.....	29
Figura 13. Plantas madre de frambuesa <i>Rubus idaeus</i> en Proyecto Especial CHINECAS.	46
Figura 14. Yemas de frambuesa. A. Explante contaminado. B. Explante oxidado. C. Explante con brotación.	46
Figura 15. Material vegetal sembrado en zona de incubación.	47
Figura 16. Yemas establecidas en el Tratamiento control a los 30 días.....	47
Figura 17. Yemas establecidas en el Tratamiento control a los 60 días de introducción..	48
Figura 18. Yemas establecidas en el Tratamiento 8 a los 30 días	48
Figura 19. Yemas establecidas en el Tratamiento 8 a los 60 días	49
Figura 20. Yemas establecidas en el Tratamiento 9 a los 30 días	49
Figura 21. Yemas establecidas en el Tratamiento 9 a los 60 días	50

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Composición del medio de cultivo Murashigue y Skoog (1962)	45
Anexo 2. Plantas madre de Frambuesa del Proyecto Especial CHINECAS.....	46
Anexo 3. Supervivencia de explantes	46
Anexo 4. Yemas de frambuesa establecidas en diferentes tratamientos de BAP y AG3....	47

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (AG3) sobre el establecimiento *in vitro* de yemas de frambuesa (*Rubus idaeus*) variedad Heritage, en el medio de cultivo sólido Murashigue y Skoog (MS). Se empleó un diseño experimental completamente al azar con las combinaciones de BAP (0.5, 1 y 1.5 ppm) y AG3 (0.1, 0.5 y 1 ppm), más un control sin reguladores de crecimiento, obteniendo un total de 10 tratamientos, 15 repeticiones y 150 unidades experimentales. Se evaluó el número de hojas, longitud del brote, porcentaje de sobrevivencia y porcentaje de brotes a los 30 y 60 días, obteniendo como mejor resultado al tratamiento T9 (1.5 ppm de BAP y 1 ppm de AG3) con 4.8 número de hojas, 2.47 cm de longitud de brote, 100% de sobrevivencia y 100% de porcentaje de brote a los 60 días; concluyendo que es el tratamiento idóneo para alcanzar resultados óptimos en el establecimiento de frambuesa.

Palabras Clave: establecimiento *in vitro*, *Rubus idaeus*, bencilaminopurina, Ácido giberélico

ABSTRACT

In this project the aim was to evaluate the effect of different concentrations of benzylaminopurine (BAP) and gibberellic acid (AG3) on the *in vitro* establishment of raspberry buds (*Rubus idaeus*) Heritage variety, in a solid culture medium Murashigue and Skoog (MS). A completely randomized experimental design was used with the combinations of BAP (0.5, 1 and 1.5 ppm) and AG3 (0.1, 0.5 and 1 ppm), plus a control without growth regulators, obtaining a total of 10 treatments, 15 repetitions and 150 experimental units. The number of leaves, length of shoots, percentage of survival and percentage of shoots at 30 and 60 days were evaluated, obtaining the best result for the T9 treatment (1.5 ppm of BAP and 1 ppm of AG3) with 4.8 number of leaves, 2.47 cm shoot length, 100% survival and 100% shoot percentage at 60 days; concluding that it is the ideal treatment to achieve optimal results in raspberry establishment.

Palabras Clave: establishment *in vitro*, *Rubus idaeus*, benzylaminopurine, gibberellic acid

I. INTRODUCCIÓN

Rubus idaeus, de nombre común frambuesa, pertenece al grupo de los berries cuyo interés comercial tiene una alta demanda en los últimos años por sus propiedades antioxidantes y nutritivas, ya que este fruto se caracteriza por ser rica en vitamina C, ácido fólico, potasio y con un bajo contenido de azúcar (García *et al.*, 2014).

Los métodos tradicionales de propagación de la frambuesa (reproducción sexual por semilla, asexual por esquejes o acodos) presenta inconvenientes tales como la transmisión de enfermedades de la planta madre, variabilidad genética, y un bajo porcentaje de prendimiento de las estacas (García *et al.*, 2014; Morales, 2009).

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una alternativa a la forma tradicional de producción agrícola, mediante esta técnica se pueden obtener plantines libres de virus y con características similares a la planta madre (Allcacco, 2016). Para ello el medio de cultivo más utilizado es el medio MS, con variación de reguladores de crecimiento; dentro de los cuales los más utilizados son la citoquininas, auxinas y giberelinas (Suárez, 2020). Las citoquininas como el BAP promueven la división celular y la proliferación de brote (Chimdessa, 2020); mientras que, el ácido giberélico estimula el crecimiento meristemático y la elongación del tallo (Chambe, 2008).

En México, Ruíz, *et al.* (2018) evaluaron explantes de *Rubus idaeus* (meristemas y entrenudos) en el medio MS adicionado con BAP, Tidiaturón, GA3 y AIB, con el cual encontraron que a una concentración de 1 ppm de BAP y 0.5 ppm de AG3 (sin auxinas) se logró el 56.92% de entrenudos establecidos.

Del mismo modo en Ecuador, Ugsha (2022) evaluó la respuesta de los segmentos nodales de *Rubus idaeus* a diferentes tratamientos de medio de cultivo suplementados con BAP, AG3, Kinetina, obteniendo los mejores resultados al usar el primer tratamiento (MS + 1 ppm de BAP + 0.25 ppm de AG3).

Por otro lado, Jones (2006) evaluó dos sistemas para la multiplicación de *Rubus idaeus*, medio semisólido y medio líquido en inmersión temporal utilizando medio MS complementado con BAP, AG3 y ácido ascórbico. La concentración de 2 ppm de BAP y 1 ppm de AG3 en el medio de cultivo, estimuló la multiplicación del material vegetativo, pero no encontró diferencias significativas entre los dos sistemas evaluados.

A nivel nacional, Allcacco (2016) en su investigación para desarrollar un protocolo de micropropagación *in vitro* de *Rubus idaeus* var. Heritage utilizando diferentes concentraciones de BAP y AG3, obtuvo mejor resultado con el tratamiento de 1 ppm de BAP + 0.5 ppm de AG3 en medio MS logrando 5.4 brotes por miniestaca en la etapa de multiplicación.

En la investigación de García (2014), se evaluó el efecto de los niveles de BAP (0, 1, 3 y 5 ppm) en el establecimiento de *Rubus idaeus*, concluyendo que la concentración óptima en medio de cultivo MS fue de 1ppm tras mostrar una mejor respuesta en cuanto a la longitud del brote utilizando segmentos nodales.

Con la micropropagación *in vitro* se puede obtener material vegetal libre de enfermedades (Morales, 2009), sin embargo, para optimizar el proceso de desarrollo de las plántulas es necesario encontrar las concentraciones más idóneas de los reguladores de crecimiento que no generen toxicidad en el explante (parte del tejido vegetal que se extrae para introducir en un medio de cultivo).

En base a lo anterior, con el fin de proveer información y contribuir al desarrollo de protocolos para el establecimiento *in vitro* del cultivo de frambuesa, la presente investigación plantea el siguiente problema: ¿Cuál es el efecto que tienen las diferentes concentraciones de bencilaminopurina y ácido giberélico sobre el establecimiento *in vitro* de yemas de frambuesa (*Rubus idaeus*) variedad Heritage?

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (0.5, 1 y 1.5 ppm) y ácido giberélico (0.1, 0.5 y 1 ppm) sobre el establecimiento *in vitro* de yemas de frambuesa (*Rubus idaeus*) variedad Heritage

1.1.2. Objetivos específicos

- Determinar el porcentaje de sobrevivencia de las plántulas por cada tratamiento de bencilaminopurina y ácido giberélico en el establecimiento *in vitro* de yemas frambuesa (*Rubus idaeus*) variedad Heritage.
- Identificar el efecto de las diferentes concentraciones de bencilaminopurina y ácido giberélico sobre el porcentaje de brotes obtenidos en el establecimiento *in vitro* de yemas frambuesa (*Rubus idaeus*) variedad Heritage.
- Determinar el efecto de las diferentes concentraciones de bencilaminopurina y ácido giberélico sobre el número de hojas en el establecimiento *in vitro* de yemas de frambuesa (*Rubus idaeus*) variedad Heritage.
- Determinar el efecto de las diferentes concentraciones de bencilaminopurina y ácido giberélico sobre la longitud del brote en el establecimiento *in vitro* de yemas de frambuesa (*Rubus idaeus*) variedad Heritage.

1.2. Hipótesis

- A una concentración de 1.5 ppm de BAP y 1 ppm de AG3 se obtiene mejores resultados en longitud del brote, porcentaje de brotes obtenidos y número de hojas, en el establecimiento *in vitro* de yemas de frambuesa (*Rubus idaeus*) variedad Heritage.

1.3. Justificación e importancia

La utilización de las herramientas biotecnológicas como la micropropagación *in vitro* son una gran alternativa para la producción de plántulas a gran escala, libres de patógenos y de alto rendimiento sin variabilidad genética.

Por ende, la investigación propondrá un protocolo que pueda encontrar la concentración más optima de reguladores de crecimiento que promuevan y fortalezcan la plántula desde el establecimiento sin generar toxicidad ni inhibición del crecimiento del explante.

La presente investigación se justifica porque optimizará el uso de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo para generar un protocolo que combine la concentración necesaria de BAP y AG3 desde la primera etapa del cultivo *in vitro* y así aumentar el porcentaje de supervivencia en la etapa posterior, la de multiplicación. Con este método se pretende acelerar el desarrollo del explante y así reducir costos del proceso, además de asegurar la calidad del cultivo con respecto a la planta madre, logrando no solo un impacto social en los campesinos sino también económico y técnico.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Frambueso

2.1.1. Descripción

La Frambuesa Roja o raspberry (*Rubus idaeus* L.) botánicamente pertenece a la familia de las Rosáceas, mientras que comercialmente pertenece al grupo de los “berries”, que también incluye arándanos, frutillas, grosellas, moras y zarzamoras (Bruzzone, 2005, citado por Peña, 2019). El frambueso es una planta de hábito arbustivo, con tallos alargados, erectos con el raquis espinoso. Las hojas tienen bordes dentados, su fruto está compuesto de varias drupas unidas a un mismo receptáculo (Peña, 2019).

2.1.2. Composición fisicoquímica y valor nutricional

El componente principal de las frambuesas es el agua (85-90%), contienen alrededor de un 5% de carbohidratos como fructosa y glucosa. Además de ácido cítrico (1.72%), vitaminas A, E y K, así como en ácido fólico y diversos minerales como fósforo, calcio, magnesio, potasio, manganeso o hierro (García *et al.*, 2014).

2.1.3. Variedad Heritage

Heritage es una variedad antigua introducida en la costa este de los Estados Unidos por la Universidad de Cornell en 1969. Es la variedad más cultivada en el mundo y en el país (más del 80%), produce frutos de tamaño mediano con un peso promedio de 2.2 g, color claro, buena textura y dulzor, registrando 12,8 °Brix de sólidos solubles y 2.2% de acidez (Reyes, 2020).

2.1.4. Producción mundial de frambuesa

Los 4 principales productores de frambuesa (México, Estados Unidos, Serbia y Polonia) concentran el 68% de la producción mundial de esta fruta. A finales de 2021, la producción

mundial de este *berrie* superó las 630 mil toneladas, con un incremento de 6.3% respecto al año anterior (Manrique, 2022a).

Perú tiene un gran potencial para el cultivo de frambuesa gracias a factores como clima, distancia, suelo, disponibilidad de agua, etc. (Navarro, 2019). Actualmente, se tiene una producción entre 700 y 800 toneladas de frambuesa, distribuidas en alrededor de 100 ha de cultivo, principalmente en las regiones de Arequipa y Lima con la predominancia de la variedad Heritage (Manrique, 2022b).

2.1.5. Propagación de frambuesa

El frambueso es una especie de fácil multiplicación, tanto por vía sexual como asexual. Pero estos métodos no ofrecen la garantía sanitaria suficiente para realizar plantaciones comerciales (García, 2014). Además, Según Morales (2009) tales prácticas aumentan la transmisión de enfermedades, afectando los rendimientos y la calidad de la fruta producida. Muchas veces se confunden con problemas de déficit de nutrientes, inadecuado manejo del riego o enfermedades causadas por hongos. Una forma de prevenir estas enfermedades es utilizar material vegetal libre de virus en la instalación de los huertos.

2.2. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales también conocido como micropropagación, es el proceso de colocar un explante en recipientes de vidrio o plástico con un medio de cultivo adecuado para su desarrollo, controlando condiciones ambientales como temperatura, luz, humedad, pH y en condiciones de asepsia (Rueda, 2019). Este método se ha podido desarrollar gracias a la totipotencialidad celular (Alcántara *et al.*, 2017), el cual se define como la capacidad que tienen las células vegetales para regenerar una planta completa (Rueda, 2019).

Son 5 etapas para obtener plantas *in vitro*, tal como se menciona en la Figura 1, y los explantes más utilizados para iniciar la micropropagación son las yemas, segmentos uninodales, discos de hoja, secciones de raíz y meristemos. Los meristemos son grupos de células indiferenciadas que retienen la capacidad de dividirse durante todo el ciclo de vida de una planta, y mediante el cultivo de meristemos, se pueden obtener plantas saneadas libre de patógenos (Bisio y Basiglio, 2015).

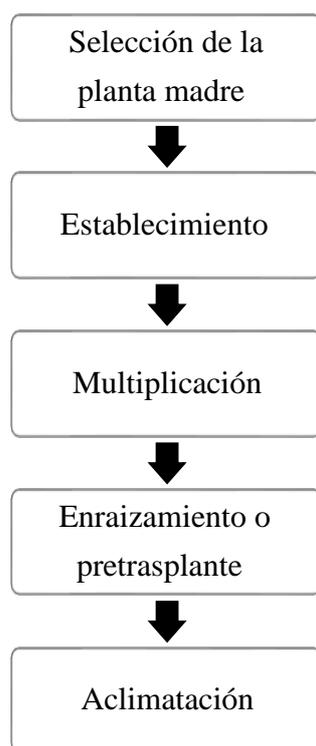


Figura 1: Etapas del Cultivo *in vitro*. *Elaboración propia*

2.2.1. Etapas de la propagación *in vitro*

- **Etapa 0: selección de la planta madre y pretratamiento**

Muchos de los contaminantes bióticos asociados a los explantes puede prevenir de la planta donadora. Por ello, antes de establecer un cultivo vegetal, es importante elegir una planta que tenga menor carga microbiana o que haya sido cultivada de forma *ex vitro* bajo condiciones óptimas (Cassells y Doyle, 2005).

- **Etapa 1: etapa de iniciación o establecimiento**

El explante es desinfectado mediante la aplicación de bactericidas y fungicidas, que no generen daño a las células vegetales para que no pierdan su actividad biológica. Luego, son transferidos a un medio nutritivo (Hussain *et al.*, 2012).

- **Etapa 2: Multiplicación de brotes**

Bajo condiciones asépticas, las plántulas se subcultivan en medios de cultivo que promuevan la rápida regeneración y proliferación de brotes (Kumar y Reddy, 2011).

- **Etapa 3: Enraizamiento o etapa pretrasplante.**

Esta etapa puede ocurrir simultáneamente en la multiplicación. En algunos casos, es necesario adicionar reguladores de crecimiento al medio de cultivo, para inducir el desarrollo de raíces (Hussain *et al.*, 2012).

- **Etapa 4: Tránsito final a la etapa de medio ambiente.**

También conocido como aclimatación. Las plantas *in vitro* pasan por un proceso de adaptación gradual en invernaderos (de alta a baja humedad y de baja a alta intensidad de luz). Luego, son transferidos a un sustrato adecuado (arena, compost, turba, etc.) que permitan un buen desarrollo (Hussain *et al.*, 2012).

2.2.2. Componentes del medio de cultivo

Los nutrientes básicos requeridos por las células vegetales en los medios de cultivo *in vitro*, son similares a los nutrientes que aporta el suelo para el desarrollo de las plantas (Perea, 2009). El medio de cultivo debe estar conformado principalmente por macronutrientes, micronutrientes, fuentes de carbono, vitaminas y aminoácidos, agentes gelificantes y reguladores de crecimiento.

- **Macronutrientes**

Los macronutrientes proporcionan los elementos minerales indispensables y cuantitativamente más abundantes en las plantas: N, P, K, Ca, Mg y S. La absorción de

cada elemento es influenciada por la concentración de otros elementos, pH, temperatura y estado bioquímico y fisiológico del tejido (Cisne, 1988).

Según Locksin y Elfving (1981), el nitrógeno es uno de los elementos más preponderantes con respecto al rendimiento y calidad de la frambuesa removiendo un mayor crecimiento del tallo, nudos, y aumenta la floración (citado por Quezada *et al.*, 2007). Por otro lado, en el caso del Potasio es importante para el frambueso porque mejora su resistencia al estrés hídrico y aumenta la resistencia a patógenos (Hirzel, 2009).

- **Micronutrientes**

Los micronutrientes esenciales Mn, Fe, Zn, Bo, Cu, Co y Mo que generalmente se encuentran presentes en los medios de cultivo son componentes de proteínas de importancia fisiológica y metabólica. Cada uno de estos elementos tiene su función específica que incide sobre la morfogénesis y crecimiento (Cisne, 1988).

En el caso del frambueso, el Zinc promueve la producción de meristemas y mejora el vigor de las plántulas, a su vez el Boro contribuye a la acumulación de reservas para una brotación futura (Hirzel, 2009).

- **Fuentes de carbono**

Debido a que la mayoría de las plantas que se cultivan *in vitro* no son autótrofos, resulta necesario adicionar una fuente de carbono al medio de cultivo. La sacarosa (2% a 5%) es la fuente de carbono que más se utiliza, y se puede reemplazar por glucosa y en menor medida por fructuosa (Roca y Mroginski, 1991).

- **Vitaminas y aminoácidos**

Las vitaminas más usadas en los medios de cultivo son: tiamina, ácido nicotínico, piridoxina, adenina, biotina, vitamina B12, ácido fólico, ácido pantoténico, riboflavina (Kyte y Kleyn, 1996). La vitamina B1 o también conocida como tiamina es la más empleada en la micropropagación *in vitro* debido a que forma parte del complejo enzimático que produce la conversión de ácido pirúvico a acetil CoA en el ciclo de Krebs.

La vitamina B6 conocido comúnmente como piridoxina está estrechamente relacionada con la conversión de compuestos alimenticios en moléculas que aportan energía y participa activamente en los procesos respiratorios (Perea, 2009).

Además, están el ácido ascórbico que se usa como antioxidante, y el mio-inositol, que promueve el crecimiento cuando se agrega a los medios de cultivo en concentraciones de 100 mg/L (Kyte y Kleyn, 1996).

Los aminoácidos sirven como fuente orgánica de nitrógeno reducido. La cisteína suele usarse como antioxidante para controlar la oxidación de fenoles y prevenir el ennegrecimiento del tejido (Chimdessa, 2020).

- **Agentes gelificantes**

Los medios de cultivo pueden ser líquidos o sólidos. Para solidificar los medios de cultivo se usan agentes gelificantes, los más utilizados son el agar, la agarosa y la goma gellan (phytagel, Gel rite) (Nagata, 1971, citado por Chimdessa, 2020).

2.2.3. Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento son compuestos, algunos naturales (hormonas) otros sintéticos, que, a muy bajas concentraciones, afectan los procesos de crecimiento y desarrollo en las plantas. Dentro de este grupo están las auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (Suárez, 2020).

- **Auxinas y su biosíntesis**

La hormona auxina promueve la diferenciación, división celular, el desarrollo embrionario, tropismo de raíces y tallos, dominancia apical y formación de flores (Balzan *et al.*, 2014).

Según Acosta *et al.* (2008) los lugares de la planta en los que se sintetiza el AIA son los ápices de coleóptilos, los tallos, y las hojas jóvenes, el cámbium y las semillas en desarrollo, pero también las hojas adultas pueden sintetizarlo.

Se tienen presentes 2 vías para la síntesis de AIA: dependiente o independiente del triptófano. Según Mano y Nemoto (2012), hay 4 vías dependientes de triptófano: La vía del ácido indol-3-pirúvico (IPA), la vía de la triptamina (TAM), la ruta de indol-3-acetaldoxima (IAOX), y la vía de la indol3acetamida (IAM). Los mismos autores mencionan que el precursor de la vía independiente de triptófano es el indol-3-glicerol fosfato, sin embargo, aún no se conocen con exactitud estas rutas.

- Citoquininas y su biosíntesis

En los medios de cultivo de tejidos vegetales, las citoquininas se incorporan principalmente para la división celular y la diferenciación de brotes adventicios de callos y órganos (Chimdessa, 2020). Las citoquininas se sintetizan tanto en las raíces como en los órganos aéreos de las plantas (Iglesias y Talón, 2008).

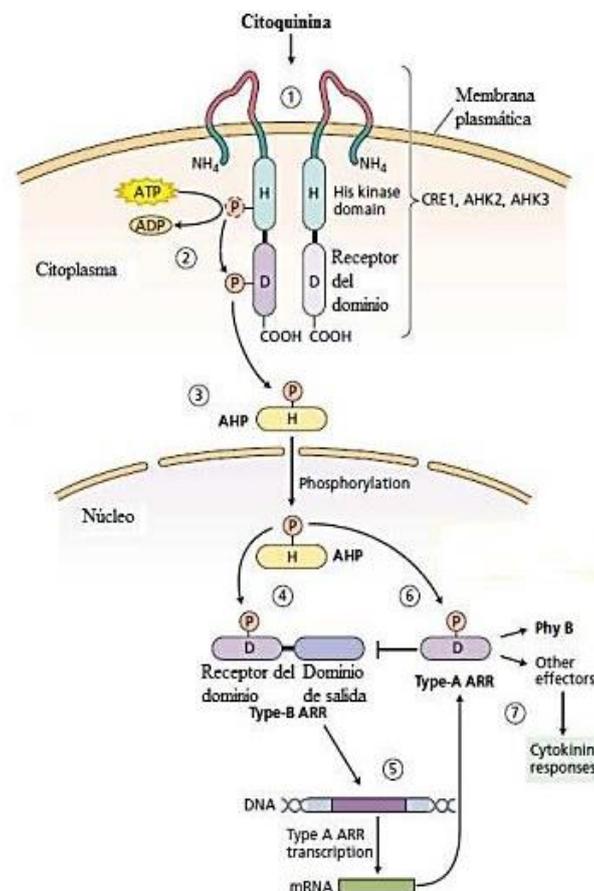


Figura 2: Mecanismo de acción de las citoquininas en la célula vegetal. Recuperado de Cerezo (2014)

A nivel celular, las citoquininas se encuentran principalmente en el apoplasto y sinplasto. En cuanto al mecanismo de acción de las citoquininas, tal como se muestra en la Figura 2, las hormonas son primero percibidas por proteínas receptoras lo cual provoca una fosforilación en su base conservada, regulando así la cascada de señales río abajo. Algunos de los receptores principales que se conocen son: CRE1/WOL/AHK4, AHK2 y AHK3, que realizan la función de transferir el grupo fosfato a nivel intracelular.

La activación de los genes inicia con la transferencia de grupos fosforilos de AHPs (proteínas HPT) a los A-ARRs y B-ARRs en el núcleo. Finalmente se activan genes relacionados con los efectos específicos de las citoquininas (Jordán y Casaretto, 2006), como los reguladores de respuesta tipo B en *Arabidopsis thaliana* activados con sus genes *ARR1*, *ARR2* y *ARR10* (Aoyama y Oka, 2003).

- **Giberelinas y su biosíntesis**

Las giberelinas son un grupo de sustancias naturales que influyen en el agrandamiento celular y la elongación del tallo (Kyte y Kleyn, 1996). Las giberelinas se sintetizan principalmente en hojas jóvenes y en las semillas. Generalmente el ácido giberélico (AG3) es empleado en el cultivo *in vitro* (Chambe, 2008).

En las plantas, la biosíntesis de giberelinas se divide en 3 etapas que se muestra en la Figura 3: la síntesis de *ent*-kaureno a partir de geranilgeranildifosfato (GGDP), la conversión de *ent*-kaureno a GA₁₂ y la conversión de GA₁₂ a las GAs.

En la Figura 4 se evidencia que, en presencia de Gas, los represores de transcripción son degradados, restableciéndose la producción normal de hormonas (Jordán y Casaretto, 2006). Los resultados se observan cuando se aplican giberelinas a algunas plantas con enanismo debido a un solo gen mutante. Tratadas con giberelina, tales plantas llegan a confundirse con las normales (Galindo, 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Proyecto Especial Chinecas, en el distrito de Nuevo Chimbote, Departamento de Áncash, Perú.

3.1. Preparación del medio de cultivo

Se preparó 1 L de medio de cultivo MS (1962, ver Tabla 16) sales completas suplementado con 30g/L de sacarosa, 2.5 g/L de phytigel y reguladores de crecimiento según la Tabla 1. En la Figura 5, se muestran los reactivos necesarios para este procedimiento, el pH del medio se ajustó a 5.8. Luego, se distribuyó 2 ml del medio de cultivo preparado en frascos de vidrio (viales), los cuales se esterilizaron en autoclave por 15 minutos a 121 °C.



Figura 5: Reactivos para la preparación del medio de cultivo.

3.2. Recolección del material vegetal

El material vegetal utilizado fue esquejes de tallos semileñosos de *Rubus idaeus* “frambuesa” variedad Heritage, los cuales se recolectaron de plantas madre de los campos del Proyecto Especial CHINECAS (Figura 13) y se muestran en la Figura 6.



Figura 6: Esquejes de frambuesa recolectados.

3.3. Desinfección del material vegetal

El material vegetal se desinfectó mediante el siguiente procedimiento. Primero se lavaron los esquejes con detergente y se retiró las impurezas con la ayuda de un cepillo de cerdas suaves. Posteriormente, los esquejes fueron enjuagados 3 veces y se seccionaron en segmentos nodales para finalmente colocarlos dentro de un frasco con agua destilada estéril.



Figura 7: Segmentos nodales preparados para la desinfección en cabina de flujo laminar.

En la Figura 7, se puede observar el material vegetal (segmentos nodales) antes de su desinfección dentro de la cabina de flujo laminar dispuestos en los frascos de vidrio con tapa. Se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 5% (v/v) durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril. Luego, se reemplazó el agua de los frascos por una solución de fungicida Farmathe (benomyl) a una concentración de 20 g/L durante 7 min. Los segmentos nodales se enjuagaron 5 veces con agua destilada estéril. Finalmente, se mantuvieron en una solución antioxidante estéril de L-cisteína a 1 g/L hasta el momento de la siembra.

3.4. Introducción *in vitro*

Antes de extraer los explantes de la solución antioxidante se realizó la desinfección del material necesario (pinzas y bisturíes). Posteriormente, con la ayuda del bisturí se retiraron

las capas superficiales oxidadas de cada explante hasta obtener cada yema a sembrar en el medio de cultivo de los diferentes tratamientos, tal como se muestra en la Figura 8. Los frascos fueron llevados a oscuridad por 7 días para acelerar la inducción de brotes y reducir la fenolización. Pasado este tiempo, se trasladaron los frascos a luminosidad con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, lugar donde se mantuvo por un periodo de 2 meses (Figura 15).

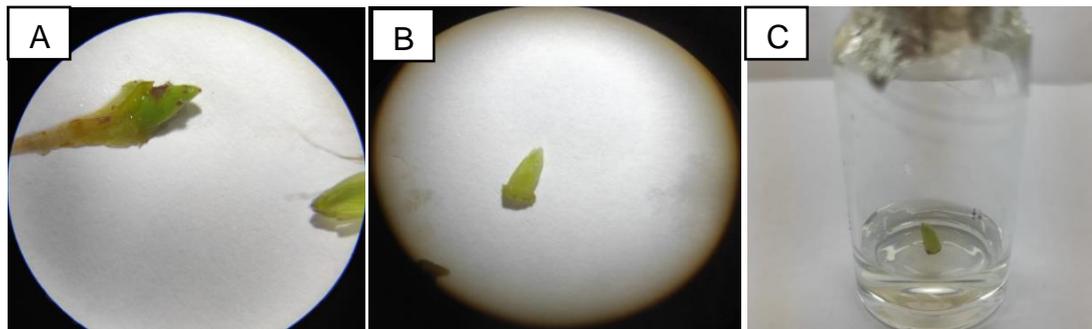


Figura 8: Introducción *in vitro* de explantes de frambuesa. A. yema vista en el estereoscopio. B. yema después de la extracción de capas superficiales. C. yema introducida en el medio de cultivo.

3.5. Evaluación biométrica

- Porcentaje de sobrevivencia

Se calculó el porcentaje de sobrevivencia dividiendo el número de explantes desarrollados (vigorosos, no oxidados y sin contaminantes microbianos) sobre el número de explantes introducidos a los 30 días.

- Porcentaje de brotes obtenidos

Se consideró como brote obtenido aquellos explantes que lograron desarrollarse. El porcentaje se calculó dividiendo el número de brotes obtenidos sobre el número de explantes introducidos por cada tratamiento a los 30 días.

- Número de hojas

Se contabilizó el número de hojas de cada explante, ya sean pequeñas o grandes por cada tratamiento a los 30 y 60 días de introducción.

- Longitud del brote

Se evaluó el tamaño del brote con la ayuda de una regla, se midió desde la base del tallo hasta el término de la hoja del explante por cada tratamiento a los 30 y 60 días de introducción.

3.6. Diseño experimental

La investigación tuvo un diseño factorial donde presentó 3 niveles por cada factor: Concentración de BAP 0.5, 1 y 1.5 ppm y concentración de AG3 0.1, 0.5 y 1 ppm, tal como se presenta en la Tabla 1.

Se evaluaron las 9 combinaciones (T1 hasta T9) de los 2 factores con sus respectivos niveles y 3 réplicas por cada combinación. Al finalizar se promedió los resultados por réplica y se realizó un análisis de varianza (ANOVA DE DOS FACTORES) a los resultados obtenidos de número de hojas, tamaño de explante, porcentaje de sobrevivencia y porcentaje de brotes obtenidos por cada combinación.

Tabla 1: Diseño experimental, concentración de BAP y AG3.

Tratamientos	[BAP] ppm	[AG3] ppm
Blanco (T0)	0	0
T1	0.5	0.1
T2	0.5	0.5
T3	0.5	1
T4	1	0.1
T5	1	0.5
T6	1	1
T7	1.5	0.1
T8	1.5	0.5
T9	1.5	1

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Porcentaje de sobrevivencia

Los resultados del porcentaje de sobrevivencia a los 30 días de establecimiento se presentan en la Tabla 2, donde se evidencia que los tratamientos T5 (BAP 1 ppm, AG3 0.5 ppm) y T9 (BAP 1.5 ppm, AG3 1 ppm) presentaron un 100% de sobrevivencia, siendo los más óptimos. Los tratamientos que presentaron un 17% de explantes contaminados u oxidados fueron el T0 (control), T2 (BAP 0.5 ppm, AG3 0.5 ppm) y T7 (BAP 1.5 ppm, AG3 0.1 ppm). Finalmente, los tratamientos que presentaron menor contaminación y oxidación fueron T1 (BAP 0.5 ppm, AG3 0.1 ppm), T3 (BAP 0.5 ppm, AG3 1 ppm), T4 (BAP 1 ppm, AG3 0.1 ppm), T6 (BAP 1 ppm, AG3 1 ppm) y T8 (BAP 1.5 ppm, AG3 0.5 ppm) con un 7% de explantes que no sobrevivieron.

Tabla 2: Porcentaje de sobrevivencia de explantes a los 30 días por cada tratamiento

Tratamientos	N° de supervivientes		N° de explantes oxidados	N° de explantes contaminados (hongo, bacteria)	% de sobrevivencia	
	BAP	AG3				
T0	0	0	13	2	0	87%
T1	0.5	0.1	14	1	0	93%
T2	0.5	0.5	13	1	1	87%
T3	0.5	1	14	1	0	93%
T4	1	0.1	14	1	0	93%
T5	1	0.5	15	0	0	100%
T6	1	1	14	0	1	93%
T7	1.5	0.1	13	0	2	87%
T8	1.5	0.5	14	1	0	93%
T9	1.5	1	15	0	0	100%

- Análisis estadístico del porcentaje de sobrevivencia

Se presenta en la Tabla 3 el análisis de varianza de dos factores del porcentaje de sobrevivencia a los 30 días de establecimiento, y se obtuvo el valor de $F = 0.5$ que es menor al valor de F crítico, a su vez la significancia $p = 0.64$ es mayor a 0.05, lo cual demuestra

que los tratamientos no generaron una diferencia significativa con respecto a la sobrevivencia de los explantes de frambuesa. Teniendo en cuenta que las concentraciones utilizadas en el proceso de desinfección fueron adecuadas, no se evidenció una alta tasa de mortalidad por oxidación, además se presenció una cantidad baja de contaminación microbiana (ejemplo en Figura 14) lo que favoreció al crecimiento adecuado de los explantes.

Tabla 3: Análisis de varianza de dos factores del porcentaje de sobrevivencia a los 30 días por cada tratamiento

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
BAP	0.666666667	2	0.333333333	0.5	0.64	6.94427191
AG3	0.666666667	2	0.333333333	0.5	0.64	6.94427191
Error	2.666666667	4	0.666666667			
Total		4				8

4.1.2. Porcentaje de brotes obtenidos

Se muestran los resultados del porcentaje de brotes obtenidos de los 15 explantes por cada tratamiento en la Tabla 4, siendo el mejor el T9 (BAP 1.5 ppm, AG3 1 ppm) con un 100% de brotes por explante introducido. Por otro lado, los tratamientos T5 (BAP 1 ppm, AG3 0.1 ppm), T6 (BAP 1 ppm, AG3 0.5 ppm) y T8 (BAP 1.5 ppm, AG3 0.5 ppm) presentaron un 93% de brotes obtenidos. Mientras que los tratamientos que presentaron menor porcentaje de brotes fueron los T0 (control) y T1 (BAP 0.5 ppm, AG3 0.1 ppm) con un 67%.

Tabla 4: Porcentaje de brotes obtenidos a los 30 días por cada tratamiento

	Tratamientos		N° de brotes	% de brotes
	BAP	AG3		
T0	0	0	10	67%
T1	0.5	0.1	10	67%
T2	0.5	0.5	12	80%
T3	0.5	1	12	80%
T4	1	0.1	11	73%
T5	1	0.5	14	93%
T6	1	1	14	93%
T7	1.5	0.1	13	87%
T8	1.5	0.5	14	93%
T9	1.5	1	15	100%

- **Análisis estadístico del porcentaje de brotes**

Se presenta en la Tabla 5 el análisis de varianza de dos factores del porcentaje de brotes a los 30 días de establecimiento, en la cual se evidencia los valores de F calculados 19.6 y 17.2 son mayores que los valores de F crítico, a su vez las significancias p son menores a 0.05, lo cual demuestra que las variaciones en la concentración de BAP y AG3 son significativas estadísticamente y tienen relación con el porcentaje de brotes obtenidos.

Tabla 5: Análisis de varianza de dos factores del porcentaje de brotes obtenidos a los 30 días por cada tratamiento

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
BAP	10.888888889	2	5.444444444	19.6	0.00857339	6.94427191
AG3	9.555555556	2	4.777777778	17.2	0.01085069	6.94427191
Error	1.111111111	4	0.277777778			
Total	21.555555556	8				

4.1.3. Número de hojas por explante

a) Resultados a los 30 días

Los resultados del número de hojas por explante se muestran en la tabla 6 donde se observa detalladamente la cantidad de hojas obtenidas por cada uno de los 15 explantes de cada tratamiento transcurridos 30 días. Los tratamientos T8 (BAP 1.5 ppm, AG3 0.5 ppm) y T9 (BAP 1.5 ppm, AG3 1 ppm) obtuvieron un mayor porcentaje de hojas a los 30 días de tratamiento, 2.13 y 2.27 respectivamente.

Tabla 6: Número de hojas por explante de frambuesa *in vitro* obtenidos a los 30 días de siembra

Tratamientos	Número de hojas por explante															Promedio		
	BAP	AG3	Repetición 1					Repetición 2					Repetición 3					
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
T0	0	0	1	0	2	0	1	1	0	1	1	2	1	1	0	1	0	0.80
T1	0.5	0.1	2	1	1	2	2	0	0	2	0	2	0	1	2	0	1	1.07
T2	0.5	0.5	2	1	0	0	1	1	0	2	2	2	1	1	2	2	3	1.33
T3	0.5	1	2	1	1	0	3	2	2	2	2	0	0	3	3	2	2	1.67
T4	1	0.1	1	0	2	1	1	0	1	2	2	2	1	0	2	0	2	1.13
T5	1	0.5	3	2	1	0	1	3	1	1	2	2	2	1	2	1	2	1.60
T6	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	0	2	2	1	2	2	3	1.47
T7	1.5	0.1	1	2	3	2	2	1	3	2	2	2	3	0	2	0	2	1.80
T8	1.5	0.5	2	2	1	2	1	3	2	2	4	2	3	3	0	3	2	2.13
T9	1.5	1	2	3	3	2	2	3	2	2	2	2	3	1	2	3	2	2.27

- Análisis estadístico del número de hojas 30 días

Se evidencia en la Tabla 7 que los valores de F calculados 33.96 y 12.89 son mayores que los valores de F crítico, a su vez las significancias p son menores a 0.05, lo cual indica que el uso de BAP y AG3 en el medio MS tiene influencia positiva sobre la formación de hojas.

Tabla 7: Análisis de varianza de dos factores del número de hojas por explante de frambuesa *in vitro* obtenidos a los 30 días de siembra

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
BAP	0.950422222	2	0.475211111	33.95712584	0.003093784	6.94427191
AG3	0.359355556	2	0.179677778	12.83922191	0.018165097	6.94427191
Error	0.055977778	4	0.013994444			
Total	1.365755556	8				

b) Resultados a los 60 días

Tras 60 días de siembra, el tratamiento T9 (BAP 1.5 ppm, AG3 1 ppm) obtuvo un promedio de 4.8 hojas siendo el mejor en cuanto a número de hojas por explante tal como se puede revisar en la Tabla 8, a su vez el tratamiento T4 (BAP 1 ppm, AG3 0.1 ppm) tuvo el promedio más bajo (2.13 hojas) similares al tratamiento control (T0: 2.07 hojas).

Tabla 8: Número de hojas por explante de frambuesa *in vitro* obtenidos a los 60 días de siembra

Tratamientos	Número de hojas por explante															Promedio		
	BAP	AG3	Repetición 1					Repetición 2					Repetición 3					
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
T0	0	0	2	2	3	3	2	2	3	2	2	3	2	2	0	3	0	2.07
T1	0.5	0.1	2	3	3	2	3	3	3	3	0	1	2	1	3	3	3	2.33
T2	0.5	0.5	4	3	0	0	3	2	0	3	4	3	2	3	3	3	5	2.53
T3	0.5	1	3	2	2	0	5	3	4	3	2	3	5	5	5	3	3	3.20
T4	1	0.1	2	0	3	3	3	2	1	2	2	2	2	3	3	1	3	2.13
T5	1	0.5	4	2	2	2	2	3	2	3	3	4	4	3	3	3	2	2.80
T6	1	1	3	2	4	3	4	3	3	4	0	4	4	2	3	3	3	3.00
T7	1.5	0.1	3	4	5	3	3	2	5	3	5	4	4	0	4	0	5	3.33
T8	1.5	0.5	4	3	3	4	3	5	4	6	6	5	5	3	0	4	4	3.93
T9	1.5	1	5	7	5	7	4	8	4	3	4	6	5	2	2	4	6	4.80

- Análisis estadístico del número de hojas 60 días

Se evidencia en la Tabla 9 que los valores de F calculados 36.43 y 17.07 son mayores que los valores de F crítico, a su vez las significancias p son menores a 0.05, esto respalda la significancia estadística del análisis estadístico realizado con los resultados de 30 días.

Tabla 9: Análisis de varianza de dos factores del número de hojas por explante a los 60 días por cada tratamiento

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
BAP	3.674866667	2	1.837433333	36.43291474	0.002708029	6.94427191
AG3	1.7214	2	0.8607	17.06609385	0.011003644	6.94427191
Error	0.201733333	4	0.050433333			
Total	5.598	8				

4.1.4. Longitud de brote

a) Resultados a los 30 días

Los resultados de la longitud de brote a los 30 días se muestran en la Tabla 10, donde se evidencia que los tratamientos T8 (BAP 1.5 ppm y AG3 0.5 ppm, Figura 18) y T9 (BAP 1.5 ppm y AG3 1 ppm, Figura 20) fueron los más óptimos con una altura promedio de 1.5 cm y 1.77 cm respectivamente. Mientras que los tratamientos con menor promedio de longitud de brote fueron el T0 (control, Figura 16) y T4 (BAP 1 ppm y AG3 0.1 ppm) teniendo valores de 0.66 y 0.69 respectivamente.

Tabla 10: Longitud del brote de frambuesa *in vitro* obtenidos a los 30 días de siembra

Tratamientos	Longitud del brote (cm)																Promedio	
			Repetición 1					Repetición 2					Repetición 3					
BAP	AG3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
T0	0	0	0.7	0.5	0.9	0.5	1.0	0.7	0.5	1.0	0.9	0.7	0.8	0.6	0.0	0.6	0.0	0.66
T1	0.5	0.1	0.7	0.6	0.6	1.1	1.0	0.5	0.5	0.6	0.0	1.2	0.5	0.6	1.0	0.5	0.7	0.74
T2	0.5	0.5	0.8	0.9	0.0	0.0	0.8	0.7	0.0	0.7	1.1	0.7	0.8	0.9	1.3	1.2	1.3	0.75
T3	0.5	1	0.7	0.7	0.9	0.0	0.8	1.1	1.0	1.0	1.1	0.5	0.5	1.5	0.9	0.7	1.2	0.89
T4	1	0.1	0.8	0.0	0.6	0.7	0.6	0.5	0.6	0.9	0.9	0.9	0.8	0.5	0.7	0.5	0.8	0.69
T5	1	0.5	1.0	1.0	0.8	0.5	0.9	1.0	0.6	0.8	1.0	0.9	0.6	0.9	0.7	1.0	0.7	0.85
T6	1	1	0.9	1.1	1.0	1.0	0.8	1.2	1.3	1.1	0.0	1.2	1.6	1.0	0.9	1.1	1.1	1.02
T7	1.5	0.1	1.3	1.2	1.8	0.9	1.4	1.5	1.4	1.1	1.4	1.9	1.2	0.0	1.1	0.0	1.4	1.17
T8	1.5	0.5	1.8	1.2	1.1	1.9	1.1	2.2	2.0	1.1	1.5	2.0	2.1	1.7	0.0	1.5	1.3	1.50
T9	1.5	1	2.0	2.0	1.9	1.8	1.9	1.7	1.8	1.6	2.0	1.4	2.0	0.5	1.0	1.5	2.2	1.77

- Análisis estadístico de la longitud del brote 30 días

El análisis de varianza de dos factores con respecto a los tratamientos tras 30 días se muestra en la Tabla 11, notando un alto grado de significancia en relación al tamaño del brote respaldado por valor F mayor que el F crítico y un valor $p < 0.05$.

Tabla 11: Análisis de varianza de dos factores de la longitud del brote de frambuesa a los 30 días por cada tratamiento

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
BAP	0.867822222	2	0.433911111	31.91826727	0.003476904	6.94427191
AG3	0.194755556	2	0.097377778	7.163056804	0.047640821	6.94427191
Error	0.054377778	4	0.013594444			
Total	1.116955556	8				

b) Resultados a los 60 días

Las longitudes de brotes obtenidos tras 60 días posteriores a la siembra de cada tratamiento se presentan en la Tabla 12, donde los tratamientos T8 (BAP 1.5 ppm y AG3 0.5 ppm, Figura 19) y T9 (BAP 1.5 ppm y AG3 1 ppm, Figura 21) fueron los más óptimos teniendo una longitud promedio de 2.37 y 2.47 cm respectivamente. Mientras que los tratamientos con menor promedio de longitud de brote fueron el T0 (control, Figura 17) y T4 (BAP 1 ppm y AG3 0.1 ppm) teniendo valores de 1.07 y 1.41 respectivamente.

Tabla 12: Longitud del brote de frambuesa *in vitro* obtenidos a los 60 días de siembra

Tratamientos	Longitud del brote (cm)															Promedio		
			Repetición 1					Repetición 2					Repetición 3					
BAP	AG3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
T0	0	0	0.9	0.9	1.2	1	1.2	1	0.8	1.5	1.3	1.2	1	1	0	0.9	0	1.07
T1	0.5	0.1	1.5	1.5	1.5	1.7	1.5	1.5	1.5	1.6	0	1.7	1.3	1.5	1.8	1.5	1.5	1.54
T2	0.5	0.5	1.6	1.5	0	0	1.5	1.4	0	1.5	1.8	1.5	1.5	1.4	1.8	1.7	2	1.60
T3	0.5	1	1.5	1.4	1.6	0	1.8	1.7	1.8	1.5	1.8	1.4	1.3	2	1.7	1.5	2.1	1.65
T4	1	0.1	1.4	0	1.6	1.3	1.3	1.4	1.4	1.7	1.6	1.5	1.6	1.2	1.3	1.3	1.2	1.41
T5	1	0.5	1.8	1.8	1.5	1.2	1.6	1.5	1.5	1.6	1.8	1.9	1.6	2	1.8	2	1.9	1.70
T6	1	1	1.6	2	1.6	1.3	1.5	1.8	1.8	2	0	1.7	2.1	1.9	1.6	2	2.1	1.79
T7	1.5	0.1	1.9	2	2.4	1.6	2	2	1.9	1.8	2.1	2.5	2	0	1.9	0	1.9	2.00
T8	1.5	0.5	2.3	2	1.9	2.5	1.9	2.7	2.9	2	2.1	2.9	3	2.2	0	2.6	2.2	2.37
T9	1.5	1	3	2.9	2.7	2.5	2.4	2.8	2.7	2.3	3	2	2.5	1.5	1.8	2	3	2.47

- **Análisis estadístico de la longitud del brote 60 días**

El análisis de varianza de los factores BAP y AG3 con respecto a la longitud de brote (cm) tras 60 días de tratamiento mostrado en la Tabla 13, resalta la significancia estadística con el valor $p < 0.05$ y el F calculado mayor al F crítico.

Tabla 13: Análisis de varianza de dos factores de la longitud del brote de frambuesa a los 60 días por cada tratamiento

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
BAP	0.886466667	2	0.443233333	43.10210697	0.001966375	6.94427191
AG3	0.1664	2	0.0832	8.09076175	0.039283673	6.94427191
Error	0.041133333	4	0.010283333			
Total	1.094	8				

4.1.5. Modelo estadístico para la longitud de brote y número de hojas

Utilizando un diseño central con el programa Minitab 17 se generó un modelo estadístico con puntos axiales (rango de combinaciones entre 0.5 – 1.5 ppm de BAP y 0.1 – 1 ppm AG3) que pueda predecir resultados de longitud de brote y número de hojas de *Rubus idaeus* en el establecimiento *in vitro* utilizando yemas como explante.

- **Modelo para longitud de brote**

Resumen del modelo

S	R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)	R-cuadrado (pred)
0.0452867	99.19%	98.49%	95.07%

$$Y \text{ LONG} = 2.034 - 1.872 \text{ BAP} + 0.579 \text{ AG3} + 1.184 \text{ BAP} \cdot \text{BAP} - 0.547 \text{ AG3} \cdot \text{AG3} + 0.385 \text{ BAP} \cdot \text{AG3}$$

Figura 9. Modelo estadístico para longitud de brote de *Rubus idaeus*

El modelo generado presenta un R2 mayor al 98% denotando la precisión del mismo teniendo en cuenta el efecto individual del BAP y A3, efecto cuadrático y efecto de la interacción de las hormonas en la longitud de brotes de *Rubus idaeus* en el establecimiento in vitro usando yemas como explante. En la tabla 14, se muestran los resultados obtenidos con el modelo generado.

Tabla 14: Datos del modelo estadístico y datos experimentales de longitud de brote tras 60 días

LONGITUD BROTE			
[BAP]	[AG3]	MODELO	EXPERIMENTAL
ppm	ppm		
0.5	0.1	1.47	1.54
0.5	0.5	1.64	1.60
0.5	1	1.62	1.65
1	0.1	1.44	1.41
1	0.5	1.69	1.70
1	1	1.76	1.79
1.5	0.1	2.00	2.00
1.5	0.5	2.33	2.37
1.5	1	2.50	2.47

En la Figura 10 se compara los datos predichos versus los datos experimentales de longitud de brote, corroborando la precisión del modelo obtenido.

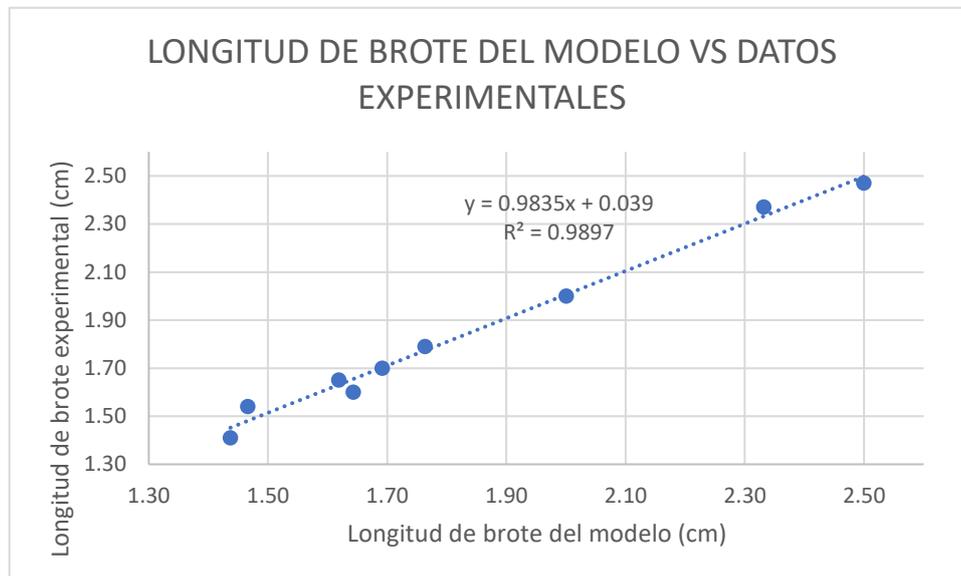


Figura 10. Comparación de los datos del modelo estadístico y datos experimentales de longitud de brote tras 60 días

- **Modelo para número de hojas**

Resumen del modelo

S	R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)	R-cuadrado (pred)
0.156367	98.28%	96.80%	88.68%

$$Y \text{ HOJAS} = 3.565 - 4.082 \text{ BAP} + 0.724 \text{ AG3} + 2.551 \text{ BAP*BAP} - 0.152 \text{ AG3*AG3} + 0.657 \text{ BAP*AG3}$$

Figura 11. Modelo estadístico para número de hojas de *Rubus idaeus*

El modelo generado presenta un R2 mayor al 96% denotando la precisión del mismo teniendo en cuenta el efecto individual del BAP y A3, efecto cuadrático y efecto de la interacción de las hormonas en el número de hojas de *Rubus idaeus* en el establecimiento *in vitro* usando yemas como explante. En la tabla 15 se muestran los resultados obtenidos con el modelo generado.

Tabla 15: Datos del modelo estadístico y datos experimentales de longitud de brote tras 60 días

NÚMERO HOJAS			
[BAP]	[AG3]	MODELO	REAL
ppm	ppm		
0.5	0.1	2.27	2.33
0.5	0.5	2.65	2.53
0.5	1	3.06	3.20
1	0.1	2.17	2.13
1	0.5	2.69	2.80
1	1	3.26	3.00
1.5	0.1	3.35	3.33
1.5	0.5	4.00	3.93
1.5	1	4.74	4.80

En la Figura 12 se compara los datos predichos versus los datos experimentales de longitud de brote, corroborando la precisión del modelo obtenido.

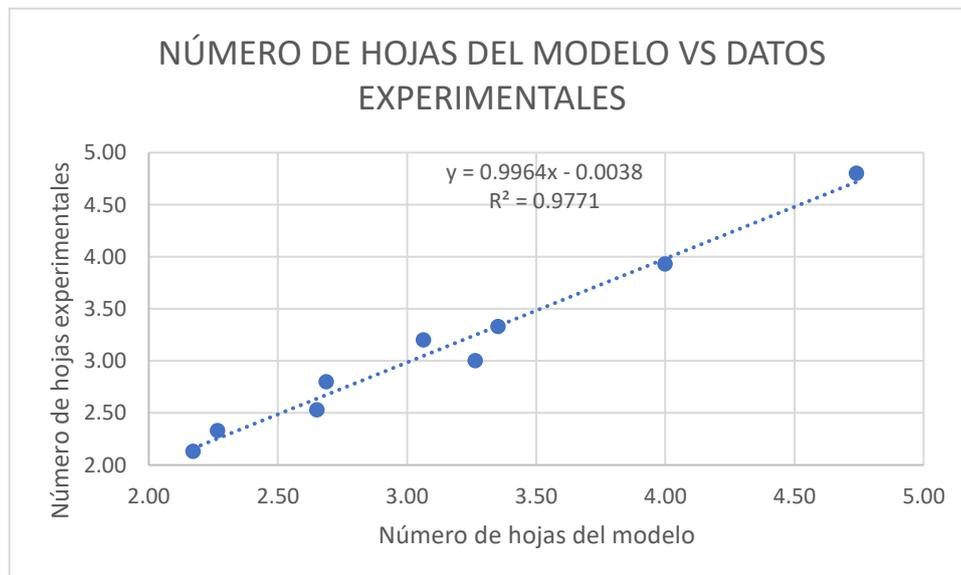


Figura 12. Comparación de los datos del modelo estadístico y datos experimentales de número de hojas tras 60 días.

4.2. Discusión

4.2.1. Porcentaje de sobrevivencia

En base al tratamiento de desinfección aplicado en la presente investigación se obtuvieron un promedio mayor al 92 % de sobrevivencia (considerando el promedio de los tratamientos 1 al 9) lo cual es óptimo en comparación con los datos mostrados por Hine y Abdelnour (2013) quienes obtuvieron apenas 8% y 2% de sobrevivencia en berries utilizando 2% y 1.5% de NaClO durante 20 minutos en su tratamiento de desinfección. Este es un paso importante durante el establecimiento *in vitro* para reducir la contaminación microbiana porque dichos microorganismos limitan el crecimiento de los explantes. Sin embargo, este proceso tiende a ocasionar estrés en los tejidos manifestándose en la oxidación y posterior muerte del material vegetal.

Por otro lado, Allcaco (2016) presentó resultados similares de sobrevivencia (90%) al utilizar 2.5% de NaClO por 15 minutos, datos que sugieren que la concentración de 5% de NaClO usada en la presente investigación podría disminuirse para obtener menos explantes oxidados.

En esta investigación, los explantes se colocaron en una solución de L-cisteína que es ampliamente usado para controlar la oxidación. De acuerdo con George y Sherrington, citados por Sánchez y Salaverría (2004), la cisteína actúa de forma rápida en la eliminación de cualquier quinona que se haya liberado del tejido vegetal. En las investigaciones de Sigarroa y García (2011) se presentó un bajo nivel de fenolización en el establecimiento de *Rubus glaucus* Benth tras usar antioxidantes como l-cisteína tanto en enjuagues como en el medio de cultivo, datos que contrastan positivamente con la utilización de 1g/L de l-cisteína en nuestro procedimiento de post desinfección.

Es importante resaltar que, luego de la introducción de los explantes en el medio de cultivo se mantuvieron por 7 días en oscuridad. Esto concuerda con Rosas (2021) quien señala que

un período de incubación en oscuridad durante 8 días afecta positivamente en la reducción del proceso oxidativo de los tejidos vegetales.

4.2.2. Porcentaje de brotes obtenidos

Villazon (2017) tuvo un porcentaje de brotes obtenidos (expresados como porcentaje de regeneración en establecimiento) en dos especies del género *Rubus* de 41.11% utilizando 1 ppm de BAP y 33.33% utilizando 2 ppm de BAP a los 30 días, resultados muy por debajo de los obtenidos en el tratamiento T9 (BAP 1.5 ppm, AG3 1 ppm) con un porcentaje de 100% en el mismo tiempo de evaluación, lo cual resalta la sinergia del BAP y AG3 con respecto a la brotación en la etapa de establecimiento *in vitro* de *Rubus idaeus*.

Son muchos factores los que influyen en el desarrollo *in vitro* de los explantes vegetales, dentro de los cuales, según Kumar y Reddy (2011), están el tipo de explante, edad, genotipo, orientación y posición del explante, la composición del medio de cultivo incluyendo los reguladores de crecimiento. Como menciona Alcántara *et al.* (2019), existen hormonas producidas internamente por las plantas, tal como se logró evidenciar en el tratamiento control (T0) que, a pesar de no haber adicionado reguladores de crecimiento al medio de cultivo el 67 % de explantes se desarrollaron con normalidad. Sin embargo, es importante resaltar que las hormonas endógenas no son suficientes para promover un desarrollo óptimo de los explantes, es por ello que se suele utilizar reguladores vegetales exógenos, puesto que son más potentes, lo cual se ve reflejado en el tratamiento T9 (BAP 1.5 ppm, AG3 1 ppm) que tuvo las concentraciones más óptimas logrando el desarrollo del 100 % de los explantes introducidos.

Es importante mencionar que Kim y Dai (2020) recomiendan además utilizar tejidos jóvenes y una adecuada concentración de reguladores de crecimiento para lograr la inducción de desarrollo esperado en los explantes, dato importante que se consideró en la etapa de establecimiento.

Las citoquininas, como el BAP, se encargan de promover la división celular, además potencian el desarrollo de brotes y la diferenciación de los tejidos vegetales; el ácido giberélico potencia principalmente la elongación celular y el desarrollo de los segmentos nodales en condiciones adecuadas de luz y oscuridad (Alcántara *et al.*, 2019). En los resultados del presente estudio la combinación de BAP y AG3 influyó positivamente en la inducción de brotes, esto según Jones (2006), se debe a que en las concentraciones adecuadas de ambos reguladores de crecimiento en el medio de cultivo MS aumenta el porcentaje de brotes obtenido con respecto a un medio sin promotores de crecimiento. Similarmente, autores como Cancino *et al.* (2015) y Muñoz y Reyes (2006) obtuvieron un mejor desarrollo de sus explantes con la sinergia de BAP y AG3 en el establecimiento *in vitro* de *Rubus glaucus*.

4.2.3. Número de hojas por explante

Los resultados de la presente investigación con respecto al número de hojas a 8.5 semanas (60 días) en el tratamiento más óptimo T9 (BAP 1.5 ppm, AG3 1 ppm) con 0.56 hojas por semana son superiores a los reportados por Ugsha (2022) con su tratamiento T1 (0.39 hojas por brote), donde utilizó un medio MS + 1 ppm BAP + 0.25 ppm AG3. Tal autor indica que la presencia de AG3 en pequeñas concentraciones potencia la generación mitótica de hojas. Al respecto, Jones (2006) reporta un promedio de 0.67 hojas por semana utilizando 1.5 ppm de BAP, mostrando resultados similares al tratamiento T9 (BAP 1.5 ppm, AG3 1 ppm). Solís (2019) reportó resultados de 3 hojas en promedio utilizando meristemas axilares como explante tras 30 días de establecimiento de *Rubus rosifolius* Sm. en un medio MS con 1.5 de BAP, datos ligeramente superiores a los reportados en esta investigación con el T9 que tuvo un promedio de 2.27 hojas en 30 días. Estas diferencias según Lápiz *et al.* (2024) se deben a que la respuesta de las hormonas como BAP presentan diferente eficacia dependiendo el

genotipo del explante, y menciona que el ácido giberélico contribuye en la formación de hojas y la elongación de brotes.

Lápiz *et al.* (2024) también menciona en su investigación que explantes del género *Rubus* tuvieron un impacto favorable en su desarrollo, tanto en el número de hojas como en longitud, debido a la presencia de 1.5ppm de BAP en el medio de cultivo, contrastando positivamente con lo mostrado en los tratamientos T8 (BAP 1.5 ppm y AG3 0.5 ppm) y T9 (BAP 1.5 ppm, AG3 1 ppm); además afirma que concentraciones superiores a la mencionada producen un efecto adverso.

4.2.4. Longitud de brote

Solís (2019) presentó una longitud promedio de aproximadamente 1 cm a los 30 días utilizando un medio de cultivo con 1 ppm de BAP en *Rubus rosifolius* Sm., resultados muy por debajo de los tratamientos T8 (BAP 1.5 ppm y AG3 0.5 ppm) y T9 (BAP 1.5 ppm, AG3 1 ppm) que tuvieron una longitud promedio de 1.55 y 1.77 cm respectivamente en el mismo periodo de evaluación. Sin embargo, estos datos difieren a lo reportado por Jones (2006) que obtuvo una altura de entre 1 a 2 cm en tan solo 3 semanas utilizando un medio MS suplementado con 1.5 ppm de BAP. De acuerdo con Sigarroa y García (2011), la presencia de AG3 a 0.5 ppm en combinación con BAP en el medio de cultivo manifestó una mayor elongación con desarrollo foliar, esto debido a que las giberelinas inciden en el alargamiento celular, principalmente de entrenudos e incrementan la producción de auxinas endógenas, además comenta que la concentración óptima de esta hormona se encuentra en el rango de 0.1 – 1 ppm, ya que altas concentraciones de esta hormona pueden ser perjudiciales para el tejido vegetal generando un alto porcentaje de mortalidad (Andrade *et al.*, 2021).

Villazon (2017) mostró una longitud promedio de brote de 1.15 cm en la etapa de establecimiento *in vitro* de *Rubus idaeus* utilizando 1 ppm de BAP y 1.12 cm utilizando 2 ppm de BAP a los 30 días, datos ligeramente por debajo del promedio de los tratamientos

T7 (BAP 1.5 ppm y AG3 0.1 ppm), T8 (BAP 1.5 ppm y AG3 0.5 ppm) y T9 (BAP 1.5 ppm, AG3 1 ppm) de la presente investigación, lo cual refleja la significancia del uso de AG3 en la etapa de establecimiento *in vitro*.

V. CONCLUSIONES

- La desinfección utilizada en la presente investigación permitió obtener un alto porcentaje de explantes sobrevivientes (promedio mayor a 92%, considerando el promedio de los tratamientos 1 al 9). No obstante, no se evidenció significancia estadística entre porcentaje de sobrevivencia y las concentraciones de BAP y AG3 en los tratamientos realizados, esto se relaciona principalmente con factores como la oxidación y los patógenos internos del explante.
- Se evidenció un efecto positivo sobre el porcentaje de brotes obtenidos en los tratamientos con un promedio del 85%, comparados con el tratamiento control (T0) que obtuvo un 67%, obteniendo un valor p menor al 0.05 lo cual resalta la significancia estadística del experimento respecto a esta variable.
- Se determinó el efecto de las concentraciones de BAP y AG3 utilizadas en el presente estudio determinando que la concentración más óptima fue el tratamiento T9 (BAP 1.5ppm, AG3 1ppm) que logró un promedio de 4.80 número de hojas a los 60 días del establecimiento de *Rubus idaeus* variedad Heritage, siendo estadísticamente significativo por el valor p obtenido menor al 0.05.
- Se determinó el efecto de las concentraciones de BAP y AG3 utilizadas en el presente estudio determinando que la concentración más óptima fue el tratamiento T9 (BAP 1.5ppm, AG3 1ppm) que logró un promedio de 2.47 cm en longitud de brote a los 60 días del establecimiento de *Rubus idaeus* variedad Heritage, siendo estadísticamente significativo por el valor p obtenido menor al 0.05.

VI. RECOMENDACIÓN

- Se deben realizar estudios utilizando diferentes antioxidantes en el medio de cultivo para evitar la muerte de los explantes por oxidación.
- Se recomienda profundizar en el uso de otros reguladores de crecimiento en el establecimiento *in vitro* de frambuesa ya que según lo mostrado en la presente investigación se puede mejorar aún más el rendimiento en esta etapa.
- Se recomienda considerar el cultivo *in vitro* con yemas como explante ya que se mostró un alto porcentaje de plántulas no contaminadas, datos no muy lejanos al cultivo con meristemas, pero mucho más práctico.
- Se recomienda realizar ensayos de desinfección utilizando otras concentraciones de agentes desinfectantes que sean menos fitotóxicos.

VII. REFERENCIAS

- Acosta, M., Sánchez, J. y Bañón, M. (2008). Auxinas. En Azcón, J. y Talón, M. (Eds.), *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (2nd ed., 377-394). McGraw Hill Education.
- Alcántara Cortes, J., Castilla Pérez, M. y Sánchez Mora, R. (2017). Importancia de los cultivos vegetales *Invitro* para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. *Biociencias* (UNAD), 1(1).
<https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/Biociencias/article/view/2222>
- Alcántara Cortes, J., Acero Godoy, J., Alcántara Cortés, J. y Sánchez Mora, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109-129.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200109&lng=en&tlng=es.
- Allcacco Cuya, J. (2016). *Estandarización de un medio de cultivo para la propagación clonal in vitro de Rubus idaeus var. Heritage "Frambuesa roja" de importancia comercial* [tesis de pregrado, Universidad Ricardo Palma].
<https://repositorio.urp.edu.pe/handle/20.500.14138/1009>
- Andrade, A., Gómez, L., Torres, Y. y Aguilera Arango, G. (2021). Evaluation of growing media for the *in vitro* establishment, multiplication and rooting of blackberry (*Rubus glaucus* Benth.). *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 37(2), 117-127.
<https://doi.org/10.29393/chjaas37-14emag40014>
- Aoyama, T. y Oka, A. (2003). Transducción de señales de citoquinina en células vegetales. *Journal of Plant Research*, 116(3), 221-231. <https://doi.org/10.1007/s10265-003-0094-6>

- Balzan, S., Johal, G., y Carraro, N. (2014). The role of auxin transporters in monocots development. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00393>
- Bisio, C. y Basiglio, M. (2015). Mejor sanitas. En Sharry, S., Adema, M. y Abedini, W. (Eds.), *Plantas de Probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro* (171-175). Editorial de la Universidad Nacional de la Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/46738>
- Cancino Escalante, G., Quevedo García, E., Edilia Villamizar, C. y Díaz Carvajal, C. (2015). Propagación *in vitro* de materiales seleccionados de *Rubus glaucus* Benth (mora de Castilla) en la provincia de Pamplona, región nororiental de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XVII(2), 7-15. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54262>
- Cassells, A. y Doyle, B. (2005). Pathogen and Biological Contamination Management: The Road Ahead. En Loyola Vargas, V. M. y Vázquez Flota, F. (Eds.), *Plant Cell Culture Protocols* (2nd ed., 318, 35-50). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:035>
- Cerezo, J. (2014). *Fisiología Vegetal*. Universidad Politécnica de Cartagena.
- Chambe Chambilla, E. (2008). *Introducción al sistema de cultivo in vitro y micropropagación de cinco ecotipo de orégano (Origanum vulgare L.) en condiciones de laboratorio* [tesis de pregrado, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann]. <https://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/20.500.12510/1188>
- Chimdessa, E. (2020). Composition and Preparation of Plant Tissue Culture Medium. *Tissue Culture and Bioengineering*, 3, 120. <https://doi.org/10.29011/2688-6502.000020>

- Cisne Contreras, J. (1988). *Introducción a la técnica de cultivo de tejidos vegetales* [tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria].
<https://repositorio.una.edu.ni/id/eprint/2546>
- Galindo, P. (2013). *Confirmación de NANA como un mutante afectado en el reloj circadiano*. Universidad Politécnica de Cartagena.
<https://repositorio.upct.es/server/api/core/bitstreams/82e8ec2a-4bcd-49f9-9347-b6bd7aeb930c/content>
- García Rubio, J., García Gonzáles, G. y Ciordia Ara, M. (2014). *El cultivo del frambueso*. Servicio general de investigación y desarrollo agroalimentario (SERIDA).
<https://bibliotecadigital.ciren.cl/handle/20.500.13082/147849>
- García Zare, E. (2014). *Efecto de los niveles de bencilaminopurina en el establecimiento in vitro a partir de nudos de frambuesa (Rubus idaeus L.)* [tesis de maestría, Universidad Nacional de Trujillo]. <https://hdl.handle.net/20.500.14414/3917>
- Gibberellins and Auxin Have Diverse Effects but a Similar Mechanism of Action. (s.f.).
https://digfir-published.macmillanusa.com/pol2e/pol2e_ch26_3.html
- Heyl, A., Werner, T. y Schmülling, T. (2007). Cytokinin Metabolism and Signal Transduction. *Plant Hormone Signaling*, 93-123.
<https://doi.org/10.1002/9780470988800.ch4>
- Hine Gómez, A. y Abdelnour Esquivel, A. (2013). Establecimiento *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). *Tecnología en Marcha*. 26(4), 64-71.
<https://doi.org/10.18845/tm.v26i4.1584>
- Hirzel, J. (2009). Fertilización. En *Aspectos relevantes en la producción de frambuesa (Rubus idaeus L.)*. INIA N°192.

<https://biblioteca.inia.cl/server/api/core/bitstreams/3b51b07f-4ad9-4435-83ba-aed20b21558f/content>

Hussain, A., Ahmed, I., Nazir, H. y Ullah, I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. <https://doi.org/10.5772/50568>

Iglesias, D. y Talón, M. (2008). Giberelinas. En J. Azcón, y M. Talón (Eds.), *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (2nd ed., 399-420). McGraw Hill Education.

Jones Castro, F. (2006). *Establecimiento in vitro y micropropagación de Frambuesa (Rubus idaeus L.) utilizando medio semisólido y medio líquido en RITA* [tesis de pregrado, Instituto Tecnológico de Costa Rica]. <https://hdl.handle.net/2238/444>

Jordán, M. y Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas, Citocininas. En F. Squeo y L. Cardemil (Edits.), *Fisiología Vegetal*. Ediciones Universidad de La Serena.

Kim, C. y Dai, W. (2020). Plant regeneration of red raspberry (*Rubus idaeus*) cultivars “Joan J” and “Polana”. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 56(3), 390–397. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10051-1>

Kumar, N. y Reddy, M. (2011). *In vitro* Plant Propagation: A Review. *Journal of Forest Science*, 27(2), 61-72. <https://doi.org/10.7747/JFS.2011.27.2.1>

Kyte, L. y Kleyn, J. (1996). *Plants from test tubes: An Introduction to Micropropagation* (3^{ra} Edición). Timber Press.

Lápiz Culqui, Y., Meléndez Mori, J., Tejada Alvarado, J., Eyner Huaman, D. C., Núñez Zarantes, V. M. y Oliva, M. (2024). Study of the physicochemical characteristics, antimicrobial activity, and *in vitro* multiplication of wild blackberry species from the

- Peruvian highlands. *Scientific Reports*, 14(3863). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54058-0>
- Mano, Y. y Nemoto, K. (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*, 63(8), 2853-2872. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers091>
- Manrique, R. (2022a). *Producción mundial de frambuesa alcanzó las 637.918 toneladas en 2021*. Recuperado de Agencia Agraria de Noticias. <https://agraria.pe/noticias/produccion-mundial-de-frambuesa-alcanzo-las-637-918-tonelada-29355>
- Manrique, R. (2022b). *La frambuesa continúa trazando su presente productivo en el país*. Recuperado de Redagrícola. <https://www.redagricola.com/pe/la-frambuesa-continua-trazando-su-presente-productivo-en-el-pais/>
- Martín, J. (2013). *Estudio del papel del ácido abscísico como señal reguladora del proceso de Micorrización* [Tesis de doctorado, Universidad de Granada]. <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/29504/21862874.pdf>
- Morales, C. (2009). *Cultivo de berries: Consideraciones generales*. Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/7414>
- Mroginski, L., Sansberro, P. y Flaschland, E. (2010). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En V. Echenique, G. Levitus, C. Rubinstein, E. Hopp, y L. Mroginski (Eds.), *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II* (18-24). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA.
- Muñoz Quijano, I. y Reyes Sandino, H. (2006). Efecto de reguladores de crecimiento, L-cisteína y ácido ascórbico en el cultivo *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus* benth) [tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria]. <https://repositorio.una.edu.ni/id/eprint/2001>

- Navarro Brioso, K. (2019). *Efecto del mulching orgánico e inorgánico en frambueso (Rubus idaeus L.) Cultivar heritage bajo macrotunel en Huaripampa, Huari-Ancash-2018* [tesis de pregrado, Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo]. <http://repositorio.unasam.edu.pe/handle/UNASAM/3494>
- Peña, P. (2019). *Multiplificación por estacas de raíz en Rubus idaeus* [seminario de pregrado, Universidad Nacional de Río Negro]. <https://rid.unrn.edu.ar/jspui/handle/20.500.12049/2489>
- Perea, M. (2009). *Cultivo de tejidos vegetales in vitro: manual de practicas de laboratorio*. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/79882>
- Quezada, C., Vidal, I., Lemus, L. y Sánchez, H. (2007). Efecto de la fertilización nitrogenada sobre rendimiento y calidad de fruta en frambueso (*Rubus idaeus L.*) bajo dos programas de fertirrigación. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*, 7(3), 1-15. <https://doi.org/10.4067/S0718-27912007000300001>
- Reyes, E. (2020). *Ensayo comparativo del uso de distintas fuentes de fertilización en el rendimiento del cultivo de frambuesa (Rubus idaeus L.) en condiciones agroecológicas de Chavinillo, Yarowilca 2018* [tesis de pregrado, Universidad Nacional Hermilio Valdizán Huánuco]. <https://hdl.handle.net/20.500.13080/6168>
- Roca, W. y Mroginski, L. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 969.
- Rosas Rojas, M. (2021). *Regeneración in vitro y descripción morfológica de genotipos de frambuesa (Rubus idaeus L.)* [tesis de maestría, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo]. http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/6412

- Rueda Chacón, N. (2019). *Actualización de los conceptos asociados con la regeneración celular en plantas* [tesis de pregrado, Universidad de Santander]. <https://repositorio.udes.edu.co/handle/001/1063>
- Ruíz Anchondo, T., Adriano Martínez, J., Carrillo Castillo, T., Parra Quezada, R. A., Ojeda Barrios, D. L. y Hernández Rodríguez, A. (2018). Establecimiento *in vitro* de dos cultivares liberados de frutillas: fresa y frambuesa. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(4), 799-812. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i4.1397>
- Sakakibara, H. (2010). Cytokinin Biosynthesis and Metabolism. En Davies, P. J. (Eds). *Plant Hormones*, 95-114. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_5
- Sánchez Cuevas, M. y Salaverría, J. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). *Revista UDO Agrícola*, 4(1), 21-26. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2221549>
- Sigarroa Rieche, A. y García Delgado, C. (2011). Establecimiento y multiplicación *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.) variedad sin espinas, mediante ápices meristemáticos. *Acta Agronómica*, 60(4), 347-354. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122011000400007&lng=en&tlng=es.
- Solís Suárez, J. (2019). *Estandarización del protocolo de micropropagación in vitro de frambuesa (Rubus rosifolius Sm.) a partir de meristemas axilares* [tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/30460>
- Suárez Padrón, I. (2020). *Cultivo de tejidos vegetales*. Fondo Editorial Universidad de Córdoba. <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/ucordoba/2553>
- Tamayo, L. y Monja, K. (2021). El destino *in vitro* de una célula vegetal. *Ciencia*, 72(2), 4.

- Ugsha Chaluiza, E. (2022). *Obtención de plantas in vitro del cultivo de la frambuesa (Rubus idaeus) mediante micropropagación, en el cantón cevallos, provincia Tungurahua* [tesis de grado, Universidad Técnica de Cotopaxi Extensión La Maná]. <https://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/8965>
- Vaca Suquillo, I., Alvarez Acuña, J. y Pozo Cruz, M. (2022). Oxidation and Contamination Control in the *in vitro* Establishment of Rosa Chinensis. *Studies in Environmental and Animal Sciences*, 3(3), 1479–1493. <https://doi.org/10.54020/seasv3n3-13>
- Villazon, E. (2017). *Micropropagación in vitro de dos especies del género Rubus a partir de tres tipos de explantes* [tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria la Molina]. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/2918>

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Composición del medio de cultivo Murashigue y Skoog (1962)

Tabla 16. Composición del medio de cultivo Murashigue y Skoog.

MACRONUTRIENTES	mg/L
(NH ₄) NO ₃	1650
KNO ₃	1900
KH ₂ PO ₄	170
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
CaCL ₂ .2H ₂ O	440
MICRONUTRIENTES	mg/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CoCL ₂ .6H ₂ O	0.025
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
VITAMINAS	mg/L
Myo-Inositol	100
Tiamina HCl	0.1
Ácido nicotínico	0.5
Glicina	2
Piridoxina HCL	0.5

Anexo 2. Plantas madre de Frambuesa del Proyecto Especial CHINECAS

A partir de las plantas madre de frambuesa que se encontraron en los campos del Proyecto Especial Chinecas, se recolectaron los esquejes de tallo semileñoso como se describió anteriormente.



Figura 13. Plantas madre de frambuesa *Rubus idaeus* en Proyecto Especial CHINECAS.

Anexo 3. Sobrevivencia de explantes

Para evaluar la sobrevivencia de los explantes, se tuvo en cuenta la tasa de contaminación, oxidación y brotación, lo cual se muestra en la Figura 14.

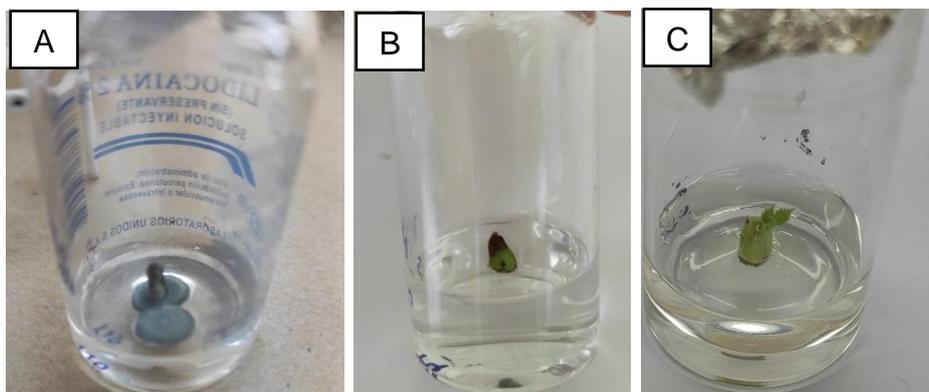


Figura 14. Yemas de frambuesa. A. Explante contaminado. B. Explante oxidado. C. Explante con brotación.

Anexo 4. Yemas de frambuesa establecidas en diferentes tratamientos de BAP y AG3

El material vegetal que se sembró en el medio de cultivo según los 10 tratamientos fueron trasladados a la zona de incubación con un fotoperiodo de 16/8.

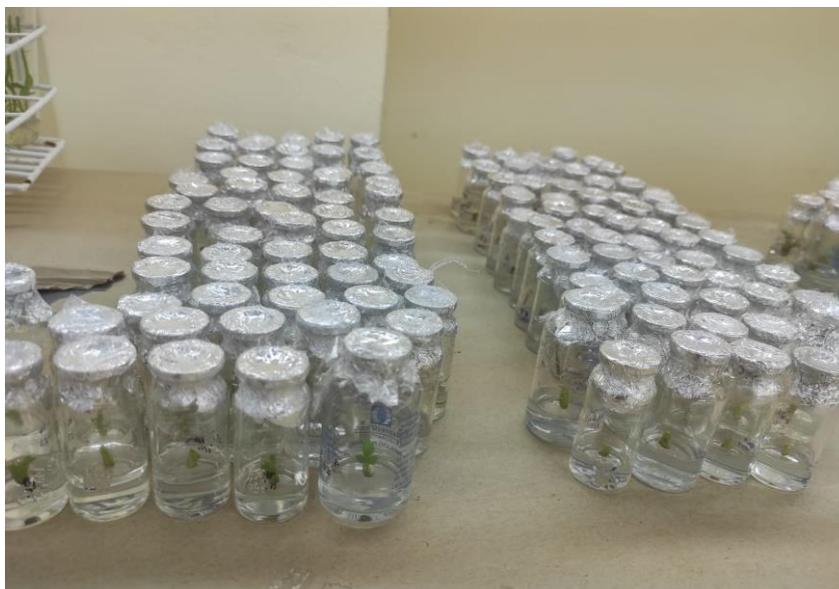


Figura 15. Material vegetal sembrado en zona de incubación.

A continuación, se presentan los tratamientos que evidenciaron mejores resultados en número de hojas y longitud de brote a comparación del tratamiento control que no contenía BAP ni AG3. La Figura 16 y 17 presenta el tratamiento control con los explantes desarrolladas a los 30 días y 60 días, respectivamente.

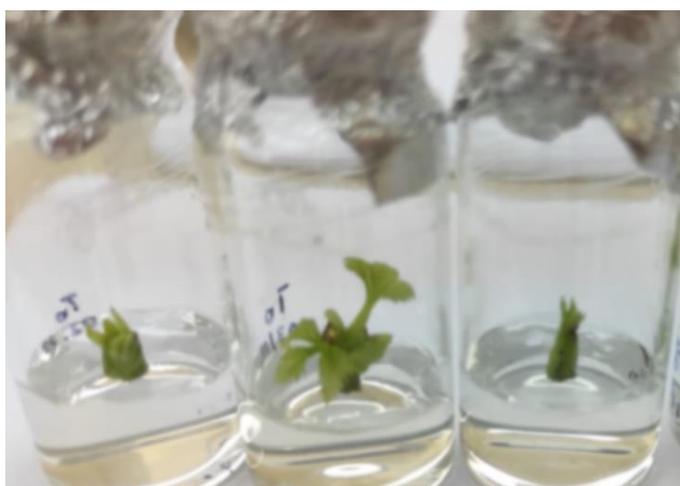


Figura 16. Yemas establecidas en el Tratamiento control a los 30 días.



Figura 17. Yemas establecidas en el Tratamiento control a los 60 días de introducción.

Por otro lado, la Figura 18 y 19 presentan las yemas desarrolladas en el medio de cultivo según el tratamiento 8 que contuvo 1.5 ppm de BAP y 0.5 ppm de AG3, en las mismas se destaca la diferencia de vigorosidad y número de hojas respecto al tratamiento control.

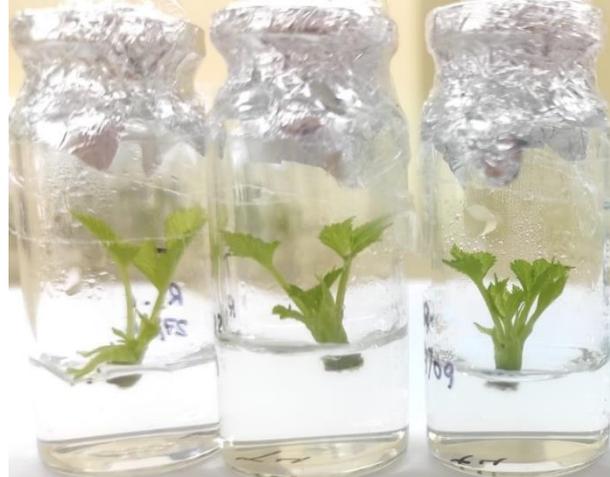


Figura 18. Yemas establecidas en el Tratamiento 8 a los 30 días



Figura 19. Yemas establecidas en el Tratamiento 8 a los 60 días

Con respecto a la Figura 20 y 21, presentan las yemas desarrolladas en el medio de cultivo según el tratamiento 9 que contuvo 1.5 ppm de BAP y 1 ppm de AG3, siendo el mejor tratamiento en número de hojas y longitud de brote.



Figura 20. Yemas establecidas en el Tratamiento 9 a los 30 días



Figura 21. Yemas establecidas en el Tratamiento 9 a los 60 días