

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMÍA



MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE DOS ESPECIES DEL GÉNERO
***Rubus* A PARTIR DE TRES TIPOS DE EXPLANTES**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADA POR:

EDSON ENRIQUE VILLAZON CAMACHO

LIMA-PERÚ

2017

DEDICATORIA

A Patricia Rosario, mi madre, el ángel que Dios puso en mi vida para guiarme. Por su amor imperecedero y apoyo incondicional.

A Julio César, mi padre, amigo y maestro. Por brindarme su apoyo, fuerza, confianza y constante motivación.

A mis hermanos Cristhian y Gabriela, mi madrina Nenita, a mis tíos José, Miguel, Roger, Jorge, y a mis primos José Luis, Estrella, América, Sofía y Sebastián.

A mis queridos abuelos Vilma, América, Timoteo, Elsa y Nicolás, y a mis tíos Carlos y Marquiños, quienes desde el cielo se encuentran siempre acompañándome.

A mi familia, quienes me acompañaron durante esta experiencia, les dedico esta obra...

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi profesor asesor el Dr. Jorge Jiménez Dávalos, por su dedicación, sus acertados consejos y la confianza transmitida. Factores vitales para lograr el resultado final de este experimento.

A mis compañeros y personal del laboratorio de Biotecnología y Dobles Haploides del Programa de Cereales y Granos Nativos de la Universidad. Por haber aportado enormemente en la materialización de este proyecto.

Agradezco especialmente a Angel, Piero y José, a quienes considero mis mentores, cuyos conocimientos transmitidos jugaron un papel fundamental en esta experiencia.

A Moisés, Nadin, Jimena, Camila y Yolanda, amigos que conocí al realizar esta tesis y que gracias a su constante apoyo se pudo concretar este trabajo exitosamente.

Y a tantas personas que no menciono aquí, pero que llevo en mi corazón, les agradezco tanto...

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL FRAMBUESO Y LA ZARZAMORA	4
2.1.1. TAXONOMÍA	4
2.1.2. MORFOLOGÍA DEL FRAMBUESO	4
2.1.3. MORFOLOGÍA DE LA ZARZAMORA	6
2.2. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE FRAMBUESA Y ZARZAMORA	7
2.2.1. ESTABLECIMIENTO	7
a. Tipos de explante	7
a.1. Ápices caulinares	7
a.2. Yemas axilares	8
a.3. Explantes de hojas	8
a.4. Meristemas	8
b. Desinfección	8
c. Medios de cultivo y hormonas de crecimiento para la inducción de yemas	10
d. Medios de cultivo y hormonas para la formación de brotes adventicios a partir de inducción de callos	12
2.2.2. MULTIPLICACIÓN	15
2.2.3. ENRAIZAMIENTO	18
2.2.4. ACLIMATACIÓN	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. MATERIALES	23
3.1.1. MEDIO DE CULTIVO	23
3.1.2. MATERIAL VEGETAL	24
3.1.3. MATERIALES ADICIONALES	24
a. Hormonas	24
b. Sustancias desinfectantes	24
c. Insumos	24
d. Materiales de laboratorio	24
e. Materiales para la aclimatación	24
3.1.4. EQUIPO DE LABORATORIO	24
3.2. VARIABLES DE EVALUACIÓN	24
3.2.1. ETAPA DE DESINFECCIÓN	24
a. Porcentaje de Regeneración	24
b. Porcentaje de Oxidación	25
c. Porcentaje de Fenolización	25
d. Porcentaje de Contaminación por Hongos	25
e. Porcentaje de Contaminación por Bacterias	25

3.2.2. ETAPA DE ESTABLECIMIENTO	25
a. Porcentaje de Regeneración	25
b. Porcentaje de Oxidación	25
c. Longitud de brotes por explante	25
d. Número de brotes por explante	25
3.2.3. ETAPA DE ENRAIZAMIENTO	26
a. Porcentaje de Enraizamiento	26
b. Longitud de raíces por brote	26
3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL	26
3.3.1. MODELO ADITIVO LINEAL	26
3.3.2. TRATAMIENTOS	28
3.4. PROCEDIMIENTO	29
3.4.1. PREPARACIÓN DE EXPLANTES	29
a. Ápices caulinares	29
b. Yemas axilares	29
c. Segmentos de hoja	29
3.4.2. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	29
3.4.3. DESINFECCIÓN	30
3.4.4. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	30
3.4.5. SIEMBRA DE EXPLANTE	31
3.4.6. MULTIPLICACIÓN	31
3.4.7. ENRAIZAMIENTO	31
3.4.8. ACLIMATACIÓN	32
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	33
4.1. ETAPA DE DESINFECCIÓN	33
4.1.1. PORCENTAJE DE REGENERACIÓN	33
4.1.2. PORCENTAJE DE OXIDACIÓN	34
4.1.3. PORCENTAJE DE FENOLIZACIÓN	36
4.1.4. PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN POR HONGOS	39
4.1.5. PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN POR BACTERIAS	41
4.2. ETAPA DE ESTABLECIMIENTO	46
4.2.1. PORCENTAJE DE REGENERACIÓN	46
4.2.2. PORCENTAJE DE OXIDACIÓN	47
4.2.3. LONGITUD DE BROTES	51
4.2.4. NÚMERO DE BROTES POR EXPLANTE	55
4.3. ETAPA DE ENRAIZAMIENTO	61
4.3.1. PORCENTAJE DE ENRAIZAMIENTO	61
4.3.2. LONGITUD DE RAÍCES POR BROTE	64
4.4. ACLIMATACIÓN	67
V. CONCLUSIONES	68
VI. RECOMENDACIONES	69
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Composición de las sales del Medio Murashige & Skoog (1962)	23
Tabla 2 Elementos del modelo aditivo lineal para cada fase del protocolo	27
Tabla 3 Niveles de los factores en estudio para las tres fases de la micropropagación <i>in vitro</i> de <i>Rubus</i>	28
Tabla 4 Análisis de varianza del porcentaje de regeneración en la etapa de desinfección	33
Tabla 5 Análisis de varianza del porcentaje de oxidación en la etapa de desinfección	35
Tabla 6 Análisis de varianza del porcentaje de fenolización en la etapa de desinfección	36
Tabla 7 Análisis de varianza del porcentaje de contaminación por hongos en la etapa de desinfección	39
Tabla 8 Análisis de varianza del porcentaje de contaminación por bacterias en la etapa de desinfección	41
Tabla 9 Análisis de varianza del porcentaje de regeneración en la etapa de establecimiento	45
Tabla 10 Grupos de significancia para la interacción: tipo de explante y medio de establecimiento	47
Tabla 11 Análisis de varianza del porcentaje de oxidación en la etapa de establecimiento	47
Tabla 12 Análisis de varianza de la longitud de brotes por explante en la etapa de establecimiento	53
Tabla 13 Grupos de significancia para la interacción entre tipo de explante y medio de establecimiento, para la variable longitud de brotes por explante	54
Tabla 14 Análisis de varianza del número de brotes por explante en la etapa de establecimiento	55
Tabla 15 Grupos de significancia para la interacción entre especie y medio de establecimiento, para la variable número de brotes por explante.	58
Tabla 16 Grupos de significancia para la interacción entre tipo de explante y medio de establecimiento, para la variable número de brotes por explante.	59
Tabla 17 Análisis de varianza del porcentaje de enraizamiento en la etapa de enraizamiento	61
Tabla 18 Análisis de varianza de la longitud de raíces por brote en la etapa de enraizamiento	64

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Respuesta en porcentaje de regeneración de los diferentes tipos de explantes en la etapa de desinfección	34
Figura 2 Respuesta en porcentaje de regeneración de los diferentes tratamientos de desinfección	34
Figura 3 Respuesta en porcentaje de oxidación de los diferentes tipos de explantes en la etapa de desinfección	35
Figura 4 Respuesta en porcentaje de oxidación a los tratamientos de desinfección	36
Figura 5 Respuesta en porcentaje de fenolización en los diferentes tipos de explantes	37
Figura 6 Respuesta en porcentaje de fenolización a los tratamientos de desinfección	37
Figura 7 Respuesta en porcentaje de fenolización a la interacción entre los factores tipo de explante y tratamientos de desinfección	38
Figura 8 Respuesta en porcentaje de contaminación por hongos para las especies	39
Figura 9 Respuesta en porcentaje de contaminación por hongos para los tipos de explante	40
Figura 10 Respuesta en porcentaje de contaminación por hongos a los tratamientos de desinfección	40
Figura 11 Respuesta en porcentaje de contaminación por bacterias para las especies	42
Figura 12 Respuesta en porcentaje de contaminación bacteriana para los diferentes tipos de explantes	42
Figura 13 Respuesta en porcentaje de contaminación bacteriana para los tratamientos de desinfección	43
Figura 14 Respuesta en porcentaje de contaminación bacteriana para la interacción entre especie y tipos de explante	43
Figura 15 Respuesta en porcentaje de contaminación bacteriana para la interacción entre tipos de explante y tratamientos de desinfección	44
Figura 16 Respuesta en porcentaje de regeneración para los tipos de explantes	45
Figura 17 Respuesta en porcentaje de regeneración para los medios de establecimiento.	46
Figura 18 Respuesta en porcentaje de regeneración para la interacción entre tipo de explante y medios de establecimiento	46
Figura 19 Respuesta en porcentaje de oxidación para ambas especies	48
Figura 20 Respuesta en porcentaje de oxidación para ambas especies	48
Figura 21 Respuesta en porcentaje de oxidación para los medios de establecimiento.	49

Figura 22	Respuesta en porcentaje de oxidación para la interacción especie y tipo de explante.	49
Figura 23	Respuesta en longitud de brotes para el factor especie	51
Figura 24	Respuesta en longitud de brotes para el factor tipo de explante	52
Figura 25	Respuesta en longitud de brotes frente a los medios de establecimiento	52
Figura 26	Respuesta en longitud de brotes para la interacción entre especie y tipos de explante	53
Figura 27	Respuesta en longitud de brotes para la interacción entre especie y medios de establecimiento	53
Figura 28	Respuesta en longitud de brotes para la interacción entre tipo de explante y medios de establecimiento	54
Figura 29	Respuesta en número de brotes por explante para las especies de <i>Rubus</i>	56
Figura 30	Respuesta en número de brotes por explante para los diferentes tipos de explante	56
Figura 31	Respuesta en número de brotes por explante para los medios de establecimiento	57
Figura 32	Respuesta en número de brotes por explante para la interacción especie y tipos de explante	57
Figura 33	Respuesta en número de brotes por explante para la interacción especie y medio de establecimiento	58
Figura 34	Respuesta en número de brotes por explante para la interacción tipo de explante y medios de establecimiento	59
Figura 35	Respuesta en porcentaje de enraizamiento para las especies de <i>Rubus</i>	61
Figura 36	Respuesta en porcentaje de enraizamiento para los medios de cultivo	62
Figura 37	Respuesta en porcentaje de enraizamiento para las dosis hormonales de ácido indolbutírico	62
Figura 38	Respuesta en porcentaje de enraizamiento para la interacción especie – medio de cultivo	63
Figura 39	Respuesta en longitud de raíces por brote para las especies de <i>Rubus</i>	65
Figura 40	Respuesta en longitud de raíces por brote para los medios de cultivo	65
Figura 41	Respuesta en longitud de raíces por brote para las dosis hormonales de ácido indolbutírico	66
Figura 42	Respuesta en longitud de raíces por brote para interacción entre especie y las dosis hormonales de ácido indolbutírico	66

ANEXOS

	Pág
Anexo 1 Etapa de establecimiento. Yema axilar después de cuatro días de sembrada libre de contaminantes (Izquierda). Brote de un mes de regenerado sobre el nudo de la yema axilar (derecha)	74
Anexo 2 Brote sobre nudo axilar después de una semana (izquierda) y luego de un mes (derecha) de ser sembrado en medio MS + 0.1 g/L de carbón activado.	74
Anexo 3 Brote después de un mes de ser sembrado en medio de multiplicación MS + 0.1 g/L de carbón activado y 1 mg/L de bencilaminopurina.	75
Anexo 4 Multiplicación de brotes provenientes de la yema axilar, se aprecia el empleo de bisturí y pinzas para realizar la selección.	75
Anexo 5 Brote seccionado y sembrado en medio de multiplicación (MS + 0.1 g/L de carbón activado + 1 mg/L de BAP)	76
Anexo 6 Brote enraizado en medio 1/2 MS + 1 mg/L de AIB + 0.1 g/L de carbón activado	76
Anexo 7 Plántula aclimatada (izquierda) y completamente adaptada a la vida al exterior, se aprecian las nervaduras y el desarrollo de espinas en los tallos	77

RESUMEN

Se desarrolló un protocolo de micropropagación in vitro para dos especies del género *Rubus*: frambueso (*Rubus idaeus* L.) y zarzamora (*Rubus fruticosus* L.). Para la fase de establecimiento se evaluó la respuesta de tres tipos de explantes: ápice caulinar, yema axilar y segmento de hoja. Se seleccionaron, lavaron con agua y detergente y fueron inmersos en 1g/L de Benomil por 15 minutos. A continuación se probaron cinco tratamientos para la desinfección, siendo el más eficiente la inmersión por 10 minutos en una solución de cloruro de Mercurio (1 g/L) y cinco gotas de jabón líquido.

Los explantes fueron enjuagados y preservados en cámara de flujo laminar hasta su siembra sobre los medios de establecimiento. Fueron preparados cinco tratamientos, con seis repeticiones cada una constituida por un explante. Después de un mes, los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento MS + 1 mg/L de bencilaminopurina (BAP). Las yemas desarrolladas fueron transferidas a un medio sin hormonas con 1 g/L de carbón activado por dos semanas, logrando el desarrollo de brotes que permitieron la fase de multiplicación.

Luego de dos meses se probó el enraizamiento, seis tratamientos de seis repeticiones cada una con 5 brotes, obteniéndose los mejores resultados con el medio 1/2MS + 1 mg/L de AIB. Finalmente, después de un mes de enraizadas, las plántulas fueron sembradas en tres combinaciones de sustratos y guardadas en cámara de crecimiento durante un mes, lográndose la mayor sobrevivencia con el sustrato formado por tres partes iguales de musgo, perlita y vermiculita, y convirtiéndose en plantas listas para salir al exterior.

I. INTRODUCCIÓN

Los frambuesos (*Rubus idaeus* L.) y las zarzamoras (*Rubus fruticosus* L.) pertenecen al género *Rubus*, familia Rosaceae (Jennings, citado por Hummer, 2010). Sus frutos se incluyen en el grupo de los frutos rojos o “berries”, son muy importantes y apreciados principalmente en el hemisferio norte, donde también se concentra la mayor producción mundial.

El cultivo de la frambuesa se inició en Europa cerca de hace 450 años durante el siglo XVI (Pritts, 2003; Jennings citado por Hummer, 2010). Para los inicios del siglo XIX, más de 20 cultivares de frambueso rojo fueron sembrados en Inglaterra y en los Estados Unidos, los cultivares ingleses fueron llevados a Norteamérica, donde se dieron cruces entre ellos y los cultivares americanos, obteniéndose mejores características (Pritts, 2003; Bushway et. al., 2008)

Actualmente las frambuesas se cultivan en muchas partes del mundo, con un total estimado de 578233 toneladas. Europa produce casi la totalidad (432824 toneladas), dando empleo a la agricultura y la industria de alimentos. El norte y centro de Europa (Rusia, Polonia, Serbia y Reino Unido) genera la mayoría de frutas destinadas a mercado en fresco, pero en países como Polonia, Hungría y Serbia, una alta proporción es empleada para procesamiento. Graham y Jennings en el 2009 dijeron “hay un gran interés en el cultivo en zonas del Sur de Europa”, y según datos de la FAO (2013) España ha logrado ser el quinto productor en Europa, mientras que Portugal e Italia han logrado un crecimiento considerable. En Norteamérica las regiones de mayor producción incluyen Estados Unidos y México, mientras que en Latinoamérica, Chile, Argentina y Guatemala poseen una producción extensiva. (Graham y Jennings, 2009) (FAOSTATS, 2013).

Las zarzamoras fueron recolectadas de los bordes de los campos europeos por casi 2000 años

desde la Antigua Grecia, empleadas para propósitos medicinales y otros no especificados hasta el siglo XVI. La zarzamora *perennifolia* (*Rubus laciniatus*) fue domesticada en el siglo XVII, sin embargo, la mayoría de cultivares no fueron comercialmente producidos sino hasta los siglos XIX y XX (Bushway et. al., 2008).

En Norteamérica, la depredación de bosques permitió que las zarzamoras nativas se propaguen e hibridasen. Su cultivo en América comenzó entre 1850 a 1860, siendo en 1867, que 18 cultivares fueron descritos, la mayoría de ellos fueron plantas nativas y selecciones. A fines del siglo XIX, algunos cultivares ya habían sido obtenidos por cruzamiento, o descubiertos por personas y entidades privadas. La producción alcanzó 40000 acres en los Estados Unidos en 1948, principalmente en el Sureste. Actualmente, la Costa del Pacífico en Norteamérica es una activa productora de zarzamoras y sus híbridos, habiendo un interés en desarrollar tipos sin espinas, incremento en la producción, tamaño de frutos, resistencia a enfermedades en las variedades más recientes, así como se ha obtenido una mejora en la estabilidad del color, firmeza de la pulpa y la piel, mejor sabor, mayor vida de almacén y precocidad. (Bushway et. al., 2008).

El empleo de estas frutas representa anualmente una industria global multimillonaria (Hummer, 2010). La frambuesa, es uno de los frutos de climas templados que posee mayor precio unitario en el mercado como producto fresco, además de ser de gran interés para la agroindustria (Corfo y Ciravegna, citados por Jones y Flores, 2007).

La propagación de *Rubus* se da de tres formas: hijuelos, acodos subterráneos o por cultivo de tejidos. La primera, su multiplicación natural, es la más empleada en la agricultura, aprovechando la dormancia de hijuelos soportan al trasplante (Bushway et. al., 2008). Sin embargo, en condiciones tropicales los hijuelos brotan al empezar la cosecha, su extracción compromete el desarrollo de los frutos, además son sensibles a morir por deshidratación durante el trasplante, perdiendo así material valioso. Las plantas *in vitro* son más complicadas de obtener, sin embargo su desarrollo en campo es más rápido y uniforme que el de plantas convencionales, y por lo general producen cosechas mayores y más tempranas (Bushway et. al., 2008).

Este proyecto tuvo como objetivo general evaluar la respuesta a la micropropagación *in vitro* de las especies del género *Rubus*: frambueso y zarzamora, y como objetivos específicos evaluar el efecto de las hormonas aplicadas durante cada etapa del cultivo de tejidos, determinar el explante más adecuado para inducir la formación de callos y la organogénesis somática completa de plantas de las dos especies tratadas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL FRAMBUESO Y LA ZARZAMORA:

2.1.1. TAXONOMÍA:

Los frambuesos (*Rubus idaeus* L.) y la zarzamora (*Rubus fruticosus* L.) son arbustos leñosos caducifolios pertenecientes al género *Rubus*, de la familia Rosaceae, del orden Rosales, en el superorden Rosanae, de la clase Magnoliophyta, a su vez dentro de la subdivisión Spermatophyta, de la división Tracheophyta, superdivisión Embryophyta, en el infrareino Streptophyta, subreino Viridiplantae dentro del Reino Plantae.

Según García-Rubio et. al. (2014) y Pritts (2003) al igual que todos los miembros de este género, poseen una corona perenne subterránea, la cual anualmente emite a principios de primavera, varios brotes directamente desde sus yemas o bien desde las adventicias que se forman a lo largo de todo el sistema radicular.

Waugh et. al. (1990), Pritts (2003) y Graham y Jennings (2009) afirman que los frambuesos pertenecen al subgénero *Idaeobatus* tienen la particularidad de que sus frutos al madurar, se desprenden del receptáculo en la cosecha dejando así una estructura blanca que se mantiene unida a la planta. Mientras que en los frutos de las zarzamoras, pertenecientes al subgénero *Eubatus* o actualmente renombrado *Rubus* (Clark et. al., 2007; Hummer, 2010) el receptáculo forma parte del fruto cosechado.

2.1.2. MORFOLOGÍA DEL FRAMBUESO

Sistema radicular: Se encuentra en la parte más superficial del suelo, ubicándose el 80% en los primeros 30 centímetros. Está formada principalmente por raíces finas, y por otras más gruesas, leñosas que sirven de soporte a la planta, sobre estas últimas se forman las yemas

adventicias de las que surgen anualmente los nuevos brotes, asegurando la continua producción del cultivo (Morales, 2009; García et. al., 2014).

Tallos: Pueden llegar a alcanzar más de dos metros de altura, según Morales (2009), estas ramas bianuales permanecen activas durante dos temporadas, con un crecimiento vertical en el primer periodo vegetativo y luego se inclinan debido al peso de la fruta. García et. al. (2014) mencionan que el número de brotes por planta es muy variable, depende de la variedad y la edad de la planta, pueden ser desde dos a tres en el primer año, hasta más de 20 en la planta adulta. Dependiendo del cultivar, las ramas pueden ser más o menos vigorosas y están cubiertas de un número variable de espinas en la mayoría de los casos. Los brotes reciben diferentes nombres según sea su etapa de crecimiento, primer o segundo año, se diferencian en dos tipos:

- Las *primocanes* o primocañas, corresponden a los brotes crecidos en el primer año y son llamados comúnmente hijuelos o retoños. En cultivares remontantes son los que producen frutos en el extremo superior del tallo a mediados - finales del verano y a inicios de otoño hasta el final de la temporada en abril (Morales, 2009; García et. al., 2014).
- Las *floricanes* o floricañas son los tallos ya lignificados en el segundo año. Según García et. al. (2014), reciben el nombre de cañas y están activas durante dos temporadas. Los cultivares remontantes y no remontantes producen fruta sobre ellas. (Morales, 2009)

Hojas: Según García et. al. (2014) son alternas, compuestas, estipuladas, formadas por cinco a siete foliolos, aunque según Morales (2009) presenta de tres a cinco. Estos foliolos son ovales, doblemente aserrados, de color verde en el haz el cual posee nervaduras muy marcadas, y ligeramente blanquecino a gris en el envés, el cual posee abundante vellosoidad e incluso ligeras espinas.

Flores: Se agrupan en panículas y son muy atractivas y apetecibles para las abejas ya que además de polen, producen mucho néctar. Según García et. al. (2014), la mayoría de las variedades son totalmente autógamias, sin embargo, la polinización cruzada puede mejorar las producciones. Son flores pequeñas, hermafroditas, poseen un cáliz formado por cinco sépalos verdes de vellosoidad variable, una corola de cinco pétalos de color blanco (Morales, 2009). Contiene un

gran número de estambres y ovarios (60 a 160), cada uno porta dos óvulos y generalmente uno aborta después de la diferenciación (Pritts, 2003).

Fruto: recibe el nombre de frambuesa, es una polidrupa formada por pequeñas drupas agrupadas (drupéolos) entre sí en torno al receptáculo o hipanto (Morales, 2009) del cual se desprende en la maduración, cada drupéolo presenta una única semilla (*pyrene*) (García et. al., 2014). Según Clark et. al. (2007) la integridad del fruto es mantenida gracias a unas vellosidades pequeñas que sujetan a los drupéolos entre sí. Un mes después de la polinización, ocurre la maduración del fruto que se da en tres etapas, cada una de ellas dura de 10 a 12 días (Pritts, 2003).

2.1.3. MORFOLOGÍA DE LA ZARZAMORA

Sistema radicular: Como todo *Rubus*, posee una corona que, según Perez y Vazquez (2004) bajo condiciones templadas se comporta como perenne.

Tallos: Es un arbusto espinoso de 1.5 a 2 metros de alto y entre 1 a 1.5 metros de ancho. Bajo condiciones templadas las primocañas o tallos iniciales son herbáceas y de consistencia blanda; al final de su crecimiento se vuelven leñosos y hasta el segundo año florecen y fructifican volviéndose floricañas, después la caña completa muere siendo reemplazada por una nueva. En condiciones subtropicales y tropicales, después de producir frutos la floricaña no muere, en el tallo principal ocurren brotaciones laterales donde se van a producir los nuevos frutos; sin embargo, por sanidad, facilidad de manejo y producción se realiza la poda y/o eliminación de cañas viejas (Perez y Vazquez, 2004).

Hojas: Según Giasur (2008) son compuestas de tres o cinco folíolos elípticos y de borde aserrado, dispuestos de forma palmeada. Según Perez y Vazquez (2004) tiende a ser de color verde claro el cual se torna verde oscuro al madurar las hojas. Además, en áreas templadas y subtropicales se defolia y durante el invierno las cañas permanecen dormantes; al retirarse las bajas temperaturas inician la brotación y se cubren nuevamente de follaje. En el trópico, se comportan como perennifolias, aunque en los meses invernales el crecimiento vegetativo disminuye considerablemente.

Flores: Según Giasur (2008) Se agrupan en panículas, poseen 5 sépalos y 5 pétalos blancos o rosados, sobre un receptáculo ensanchado, con numerosos estambres.

Fruto: Según Giasur (2008) recibe el nombre de zarzamora, es una polidrupa, rojiza al principio y llega a ser negra brillante cuando madura. Según Clark et. al. (2007), consiste de muchos drupéolos carnosos cada uno portador de un *pyrene* alrededor del receptáculo desarrollado o *torus*, el cual no se desprende de los drupéolos y mantiene la integridad del fruto.

2.2. CULTIVO IN VITRO DE TEJIDOS EN FRAMBUESO Y EN ZARZAMORA:

2.2.1. Establecimiento:

Consiste en obtener cultivos libres de contaminación y estructuras vegetales adaptadas a las condiciones *in vitro* y que reaccionen favorablemente a la aplicación de fitorreguladores en fases futuras (Aguirre et. al. 2010).

a. Tipos de explante:

Porciones de órganos con la mayor proporción de tejido meristemático capaces de regenerar una planta completa. Villalobos y Thorpe citados por Aguirre et. al. 2010, mencionan que el estado fisiológico de la planta madre tiene gran influencia en el posterior comportamiento de los individuos clonados.

Los explantes provienen de las primocañas en pleno crecimiento activo formadas durante la primavera y el verano después de la dormancia. Para el caso de *Rubus*, pueden ser los siguientes:

a.1. Ápices caulinares: Seleccionados de los extremos de los tallos, entre 1 a 1.5 hasta 2 a 3 centímetros de longitud, fueron empleados por Bobrowski et. al. (1996), Gajdošová1 et. al. (2005), Angelova y Arsov (2006), Minas y Neocleous (2007), Pesic-VanEsbroeck et. al. (2008), Wu et. al. (2009) y por Jadán et. al. (2015).

a.2. Yemas axilares: Secciones de tallo portadoras de una yema, empleadas de 1 a 3 hasta 5 centímetros de longitud. Fueron empleados por Reed (1990), Turk et. al. (1994), Tsao et. al.

(2000), Gajdošová1 et. al. (2005); Ostrolucká et. al. (2005); Dai et. al. (2006), Jones y Flores (2007), Clapa et. al. (2008), Wu et. al. (2009), Isac y Popescu (2009), Jafari y Hamidoghli (2009); Sigarroa-Rieche y García-Delgado (2011), Amalia et. al. (2014) y por Jadán et. al. (2015).

a.3. Explantes de hojas: Porciones de hojas con forma de disco o cuadro, tomadas del extremo superior de la planta o de las plántulas regeneradas *in vitro*. Pueden o no contener el peciolo, dependiendo del origen de las hojas hay dos tipos:

- Explante foliar primario: Obtenidos directamente de la planta madre. Cousineau y Donnelly (1991), emplearon discos foliares de 0.25 cm².
- Explante foliar secundario: Obtenidos de las plántulas *in vitro*. Cousineau y Donnelly (1991) emplearon segmentos de 0.5 a 1.5 cm² con el peciolo incluido, además de placas foliares de 0.16 a 0.36 cm²; Meng et. al. (2004), segmentos del limbo y del peciolo; Lazić y Ružić (2007), porciones de las hojas completamente expandidas; Zawadzka y Orlikowska (2006), discos foliares de los brotes de cuatro semanas; Isac y Popescu (2009) también emplearon discos de 5 a 6 milímetros de diámetro, además de peciolos de hoja; Vujović et. al. (2010) y Dziadczyk et. al. (2013), seleccionaron segmentos de 10 x 5 mm².

a.4. Meristemas: Según Pesic-VanEsbroeck (2008), formados por el domo meristemático, rodeado de una a dos hojas primordiales de 0.5 mm de longitud. Fueron empleados por Stoevska et. al. (1995); Ostrolucká et. al. (2005) y Gajdošová1 et. al. (2005).

b. Desinfección:

Permite obtener tejido descontaminado capaz de mantenerse vivo después de ser aislado. Su éxito se refuerza con pretratamientos a la planta madre o a los explantes con pesticidas. Jones y Flores (2007) emplearon una solución de jabón, para luego someterlos a tres pretratamientos: Agrimycin (2 g/L) con Bisolex (2 g/L) por 45 minutos, Agrimycin (5 g/L)

con Bisolex (5 g/L) y Ferbam (3.5 g/L) por 60 minutos, y Agrimycin (6 g/L) con Bisolex (6 g/L) y Ferbam (5 g/L) por 60 minutos. Robres-Torres et. al. (2015) utilizó Manzate (1 g/L) por 30 minutos. Sigarroa-Rieche y García-Delgado (2011), Robres-Torres et. al. (2015) emplearon detergente diluido en agua estéril y Jadán et. al. (2015) adicionalmente trató sus explantes con fungicida Phytan (0.1 por ciento) en agua esterilizada por 15 minutos.

Se recomienda la inmersión en solución de etanol a 70 y 80 por ciento (v/v), concentraciones mayores son menos efectivas llegando a deshidratar los tejidos vegetales. Stoevska et. al. (1995), Gajdošová1 et. al. (2005), Dai et. al. (2006), Wu et. al. (2009), Isac y Popescu (2009) y Jadán et. al. (2015) emplearon soluciones de etanol al 70 por ciento. Sin embargo, Sigarroa-Rieche y García-Delgado (2011) lo empleó al 94 por ciento durante siete minutos. Además de ser germicida, el etanol es surfactante y aplicado al inicio permite una mayor penetración del desinfectante en el explante (Aguirre et. al., 2010), sin embargo, Cheong et. al. (2014) utilizaron después del desinfectante una solución de etanol al 70 por ciento durante cinco minutos.

Aguirre et. al. (2010), mencionan compuestos químicos desinfectantes, entre los más comunes y menos nocivos son los compuestos clorados como el hipoclorito de sodio (NaClO) y el de calcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) y muy excepcionalmente el cloruro de mercurio (HgCl_2), siendo este último altamente tóxico y de difícil remoción en el explante.

Cousineau y Donnelly (1991), emplearon una solución al 10 por ciento de lejía por 15 minutos. Angelova y Arsov (2006) y Cheong et. al. (2014) utilizaron por 10 minutos soluciones de NaClO al 5 y 10 por ciento respectivamente, Sigarroa-Rieche y García-Delgado (2011) emplearon dos soluciones al 3 por ciento en dos tiempos de inmersión (5 y 10 minutos). Stoevska et. al. (1995) utilizó nueve tratamientos con NaClO en tres concentraciones (5, 10 y 15 por ciento) durante tres tiempos (5, 10 y 15 minutos), siendo el óptimo tratamiento el de 15 minutos al 10 por ciento; luego utilizaron una solución de HgCl_2 (0.1 por ciento) por tres minutos superando al mejor de los tratamientos. Robres-Torres et. al. (2015) utilizó una solución al 15 por ciento de hipoclorito de sodio en un tiempo de 25 minutos. Jones y Flores (2007) e Isac y Popescu (2009) emplearon soluciones de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ al 3.5 por ciento durante 15 y 14 minutos respectivamente.

Aguirre et. al. (2010) recomiendan aplicar detergentes a las soluciones desinfectantes para mejorar su adherencia sobre los tejidos, Dai et. al. (2006) añadieron tres gotas de jabón por cada 100 mililitros de solución de Clorox al 10 por ciento por 15 minutos. Se pueden emplear otros tenso activos como el Tween 20 (en concentraciones de 0.01 a 0.05 porcentaje en volumen) o el Tween 80. El primero fue empleado por Reed (1990), Tsao et. al. (2000), Jafari y Hamidoghli (2009) que añadieron las concentraciones 0.1 mL/L, en soluciones de lejía en diferentes porcentajes: al 10, 30 y 10 por ciento para emplear durante 10, 20 y 15 minutos respectivamente. El Tween 20 también fue empleado en soluciones de hipoclorito de sodio por Pesic-VanEsbroeck et. al. (2008), Wu et. al. (2009), en concentraciones de 0.79 y 0.6 por ciento durante 10 y 25 minutos respectivamente; Jadán et. al. (2015) emplearon combinaciones de 0.5, 1 y 1.5 por ciento de NaClO durante 10 y 15 minutos, logrando la máxima desinfección y la menor viabilidad de explantes con la dosis de 1,5 por ciento por 15 minutos, resultados completamente opuestos fueron alcanzados con la dosis al 0.5 por ciento por 10 minutos. Gajdošová1 et. al. (2005) añadió el Tween20 en una solución de NaClO para desinfectar por seis minutos. Amalia et. al. (2014) empleó una solución de NaClO al 1 por ciento con Tween20 por 15 minutos.

Después de la desinfección, es necesario remover los restos del producto mediante varios lavados con agua destilada esterilizada. Sigarroa-Rieche y García-Delgado (2011), luego de la desinfección, preservaron sus explantes en una solución de 150 mg/L de ácido ascórbico. Pese a una óptima desinfección es posible que permanezcan microorganismos internos, los cuales representan problemas durante el establecimiento in vitro. Tanto la desinfección como el aislamiento de los explantes deben ser realizados de forma rápida y precisa en la cámara de flujo laminar, siendo importante evitar la deshidratación del tejido (Aguirre et. al. 2010).

c. Medios de cultivo y hormonas de crecimiento para la inducción de yemas:

El medio MS (Murashige y Skoog, 1962), ha presentado resultados satisfactorios para diversas especies, *Rubus* no es la excepción. En la fase de iniciación el medio es suplementado en la mayoría de los casos con fitorreguladores para suplir deficiencias hormonales endógenas del explantes, permitiendo así el elongamiento y la multiplicación de la parte aérea. La adición de citoquininas es hasta necesaria siendo la BAP en concentraciones de 0.05 a 1 mg/L utilizado

con buenos resultados para el cultivo de ápices caulinares de varias especies leñosas. Normalmente para *Rubus* se emplean medios sólidos para esta fase. (Aguirre et. al. 2010)

Las experiencias a continuación emplean el medio MS, Reed (1990) con 0.1 mg/L de AIB y 1 mg/L de BA, habiendo realizado dos cambios de medio cada tres semanas. Bobrowski et. al. (1996) establecieron 5 variaciones, una libre de hormonas y otras cuatro combinaciones de dos dosis de BA (1 y 2 mg/L) dos de ellas suplementadas con 0.1 mg/L de ANA y 0.5 mg/L de AG₃ por 45 días, obteniendo los mejores resultados en los medios que solo contienen BA. Gajdošová et. al. (2005) suplementaron su medio con 1 mg/L BAP y 0.1 mg/L AIB obteniendo porcentajes de regeneración muy variables para cinco variedades de frambueso. Ostrolucká et. al. (2005) emplearon MS con 1 mg/L de BAP y 0.1 mg/L de AIB; Dai et. al. (2006) lo suplementó con 5.5 µM de BA, realizando subcultivos cada cuatro semanas. Jones y Flores (2007), más 1.5 mg/L de BAP.

Minas y Neocleous (2007), prepararon MS modificado con 55.7 mg/L de ácido ascórbico, con 4.45 mg/L de BAP y 0.009 mg/L de AIB, habiendo realizado un pretratamiento con oscuridad y a 22 ± 2°C durante una semana, para luego ser transferidos a una cámara de crecimiento.

Pesic-VanEsbroeck et. al. (2008), utilizaron un MS sin hormonas durante cinco a siete días. Clapa et. al. (2008) dos variantes BAP y zeatina (ambos a 1 mg/L), siendo el segundo el que promovió una mayor regeneración (66 por ciento). Jafari y Hamidoghli (2009) suplementaron 2 mg/L de BAP. Isac y Popescu (2009) formularon con 0.1 mg/L de BA, 0.5 mg/L de AG₃ y 10 mg/L de ácido ascórbico, logrando un 75 por ciento de regeneración. Sigarroa-Reiche y García-Delgado (2011) emplearon dos formulaciones: 1 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de AIA con AG₃ respectivamente, después de seis semanas el segundo medio permitió un mayor desarrollo de brotes, así como un mayor porcentaje de prendimiento (83.4 por ciento), además de un reducido porcentaje de fenolización debido al empleo del ácido ascórbico durante la conservación de los explantes y la inclusión de L-cisteína (50 mg/L) como agente antioxidante. Cheong et. al. (2014) emplearon MS suplementado con 0.25 mg/L de BAP durante cinco semanas; Robres-Torres et. al. (2015) con 1 mg/L de BA; Jadán et. al. (2015) con cinco dosis de TDZ (0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mg/L), logrando un 100% de regeneración con la tercera dosis. Amalia et. al. (2014) usaron MS 0.6mg/L de BA suplementado con gluconato de calcio (0.5 y 1 mg/L) y ácido ascórbico (50

y 100 mg/L). Tsao et. al. (2000) redujeron las concentraciones de macro, micro nutrientes y vitaminas fueron reducidas a la mitad (medio 1/2 MS) sin hormonas por siete días. Stoevska et. al. (1995) empleó el medio de Anderson modificado para frambuesa desarrollado en 1980 además del MS cada uno con tres dosis de BAP (1, 2.5 y 5 mg/L), habiéndose obtenido mejores resultados con el MS con la dosis de 1 mg/L de BAP. Angelova y Arsov (2006) emplearon el medio 1/2 MS, después de dos cambios de medio, los explantes fueron sembrados en MS completo con subcultivos mensuales.

Las formulaciones a continuación explican el cultivo de tejidos para obtener brotes *in vitro* donadores de explantes foliares: Cousineau y Donnelly (1991) cultivaron sus explantes iniciales en un MS modificado por Donnelly et. al. (1986) (aumento de 2 mg/L de tiamina), además de 0.1 mg/L de AIB y 1 mg/L de BA. Turk et. al. (1994) emplearon MS con 0.2 mM de FeNaEDTA, más 2.2 μ M de BA, realizando cambios de medio cada cuatro semanas. Meng et. al. (2004), MS suplementado con 4.4 μ M BA, 0.5 μ M AIB y 2.9 μ M AG₃. Zawadzka y Orlikowska (2006) tomaron plantas *in vitro* cultivadas por tres años en medio MS con 0.8 mg/L de BAP y 0.1 mg/L de AIB. Lazić y Ružić (2007), MS con 1 mg/L de BAP, 0.1 mg/L de AIB y 0.1 mg/L de AG₃. Vujović et. al. (2010), MS con 2 mg/L de BAP, 0.5 mg/L de AIB y 0.1 mg/L de AG₃. Dziadczyk et. al. (2013), MS con BAP (2mg/L), AIA (1 mg/L) y AG₃ (0.001 mg/L), realizando cambio de medio cada tres semanas, después de seis semanas.

El pH de los medios empleados en los trabajos se mantuvo entre 5.6 a 5.8, las condiciones del autoclave fueron 121°C de temperatura y 1.5 atm de presión las cuales se aplicaron a los medios durante 20 minutos. Las temperaturas establecidas en la cámara de incubación durante la iniciación de los cultivos *in vitro* consultados figuraron dentro del rango de 20 a 27°C, principalmente 22 y 25°C, además el fotoperiodo establecido en todos los trabajos consultados fue de 16 horas de luz y ocho de oscuridad.

d. Medios de cultivo y hormonas para la formación de brotes adventicios a partir de inducción de callos:

La organogénesis adventicia *in vitro* ha sido estudiada en diferentes genotipos del género *Rubus*, sin embargo hasta ahora no ha sido desarrollado un protocolo de regeneración eficiente, puesto que ésta varía ampliamente entre genotipos.

Graham (1997) estudió el impacto de la composición hormonal del medio de cultivo sobre organogénesis adventicia en ocho genotipos del género *Rubus*, obteniendo que la zarzamora tiene un potencial regenerativo mayor al de frambuesa.

Cousineau y Donnelly (1991) en frambueso, aplicaron dos combinaciones de factoriales AIB (0, 0.1, 0.5 y 1 mg/L) con TDZ (0, 0.5, 1, 2 y 4 mg/L) y AIB con BA a las mismas concentraciones respectivamente. Después de seis semanas se encontró que los máximos porcentajes de regeneración (70 y 50 por ciento) y el máximo número de brotes (3.7 y 1.8 brotes/explante) fueron logrados en los medios TDZ (1 mg/L) con AIB (0.5 mg/L) y BA (1 mg/L) con AIB (1 mg/L).

Turk et. al. (1994) usó las cuatro hojas más superiores de los brotes de un mes de edad, se hicieron tres cortes transversales al raquis del envés y los explantes fueron sembrados en medio MS con 10 μ M de TDZ y 0.5 μ M de AIB, notando que el mayor poder regenerativo lo poseen las hojas más cercanas al ápice. Para evaluar el efecto de las hormonas en la formación de callos, realizaron dos experimentos adicionales: sometieron explantes foliares de frambueso rojo 'Summit' y 'Sentry' a dos combinaciones factoriales de MS con TDZ (1, 10 y 20 μ M) con AIB (0.5 y 1 μ M) y BA (4, 20, 40 μ M) con AIB a las mismas dosis; y cuatro variedades (las dos mencionadas más 'Autumn Bliss' y 'Canby' a TDZ (0.3, 1, 3, 10 μ M) con AIB (0, 0.5 μ M), obteniendo como resultado que los mayores porcentajes de regeneración y número de brotes por explante son alcanzados con la dosis de 1 μ M TDZ (superior a dosis mayores del mismo, incluyendo a las dosis de BA) y que el 0.5 μ M fue la dosis más efectiva de AIB para la regeneración adventicia. La formación de brotes se dio tres semanas después de la siembra, incrementando su desarrollo en el segundo mes, sin realizar cambio de medio hasta por ocho semanas.

Meng et. al. (2004) en una primera prueba combinaron 0.1 mg/L de AIB con tres citoquininas por separado (BA, zeatina y kinetina a 1 mg/L c/u), obteniendo como resultado que la combinación BA y AIB permitió la regeneración del 70 por ciento de explantes y que el número de brotes por placa era aproximadamente 42. En una segunda prueba aplicaron 1 mg/L de BA sobre cuatro medios con auxinas (AIB, AIA, ANA y 2,4 D a 0,1 mg/L) teniendo como resultado que la combinación BA y AIB fue la más eficiente (regeneración del 70 por ciento y el número

de brotes por placa fue de casi 40), seguida por la combinación con AIA. Gajdošová et. al. (2005) emplearon MS con 0.5 mg/L de TDZ y 0.2 mg/L de 2,4-D, obteniendo un 27.5 por ciento de regeneración adventicia, en medios que solo contenían 0.1 mg/L de TDZ la regeneración fue esporádica y en el medio conteniendo 1 mg/L de TDZ ocurrió una necrosis del explante. Mészáros et. al. (2005) usaron MS suplementado con 0.5 mg/L de BA y 0.1 mg/L de AIA. Ostrolucká et. al. (2005) lograron la regeneración adventicia empleando MS con 0.5 mg/L de TDZ y 0.2 mg/L de 2,4-D.

Zawadzka y Orlikowska (2006) tomaron las hojas de cultivos de un mes de edad, emplearon MS suplementado con cuatro dosis de TDZ (0, 0.1, 0.5, 1 mg/L) en combinación con dos dosis de AIB (0.05 y 1 mg/L). El mejor porcentaje de regeneración y el mayor número de brotes fue logrado con el medio MS con TDZ (0.1 mg/L) y AIB (0.1 mg/L).

Lazić y. Ružić (2007) emplearon 20 combinaciones de MS: BAP (2 mg/L) o TDZ (1mg/L) solo o en combinación con ANA, 2,4-D o AIB cada uno en tres concentraciones (0.1, 1, 2 mg/L), la última auxina en combinación con AG₃ (0.1 mg/L). Obteniendo como resultados que la regeneración exitosa se da en los medios que poseen AIB con AG₃, pero los mejores resultados se dan en el los tratamientos con TDZ, alcanzando el máximo porcentaje regenerativo (41.66 por ciento) en el tratamiento que solo contiene TDZ y el mayor número de brotes en el medio MS con 1 mg/L de TDZ , 0.1 mg/L de AIB y 0.1 mg/L de AG₃. Mientras que el 2,4-D causa la inhibición completa de la regeneración en todos los tratamientos que lo contengan.

Vujović et. al. (2010), emplearon MS con 30 combinaciones de reguladores de crecimiento, 2 mg/L de BAP y 1 y 2 mg/L de TDZ, aplicados solos o cada uno combinado con diferentes concentraciones de AIB, ANA y 2,4-D, aplicadas a las concentraciones de 0.1, 1 y 2 mg/L cada uno. Dziadczyk et. al. (2013) tomaron hojas de brotes cultivados *in vitro* de dos a tres meses, empleando como explante segmentos de limbo y cultivándolos sobre cinco combinaciones de medio MS con reguladores: AIA (4 mg/L) con BAP (1 mg/L); 2,4-D (0.25 mg/litro); 2,4-D (0.5 mg/L); ANA (2 mg/L) con BAP (2 mg/L), y ANA (4 mg/L) con BAP (2 mg/L). Los cultivos fueron mantenidos a 23°C en oscuridad realizando cambios de medio cada cuatro semanas. Después de cinco meses, los explantes fueron llevados a un régimen de luz de

16 horas, habiéndose encontrado los callos más vigorosos, saludables y friables en el primer tratamiento

2.2.2. Multiplicación

El principal objetivo de esta fase es el de producir el mayor número de plantas posible, en el menor espacio de tiempo. La composición del medio de cultivo es un factor determinante en la multiplicación, siendo muy común el empleo de la misma composición básica de la fase de establecimiento. Respecto a los fitoreguladores, las citoquininas constituyen un grupo indispensable para la quiebra de la dominancia apical y la inducción de la proliferación de yemas axilares (Aguirre et. al. 2010).

Según Dodds y Roberts, citados por Aguirre et. al. (2010), la tasa de multiplicación es el número de explantes nuevos producidos a partir de un explante iniciado en un cierto período de tiempo. Se expresa como el cociente entre el número de explantes finales sobre el número de explantes iniciales, variando este valor enormemente de acuerdo a la especie.

Según Hasewaga, Hu y Wang, Zaerr y Mapes, citados por Aguirre et. al. (2010), BAP en concentraciones de 0.1 a 0.5 mg/L es la citoquinina más eficaz y económica para promover la multiplicación. Complementariamente, las auxinas son utilizadas para estimular el desarrollo de las partes aéreas. Según Lundergan y Janick, y Hu y Wang también citados por Aguirre et. al. (2010), las auxinas anulan el efecto inhibitorio que ejercen las citoquininas sobre el elongamiento de los cultivos, por lo tanto un exceso en su concentración puede inhibir la multiplicación y propiciar la formación de callos o el enraizamiento, los compuestos más empleados son ANA, AIB y AIA en concentraciones por debajo del 0.5 mg/L.

Reed (1990) evaluó la reacción de sus genotipos durante la etapa de iniciación, el 69% de las accesiones fueron cultivadas con éxito sobre las diversas formulaciones de medio MS empleadas, la primera, sembrados sobre el mismo medio de iniciación fue exitosa en 102 clones; la segunda (con 0.1 mg/L de AG3) se logró en 57 clones y la tercera (con 2 mg/L de BA) para 18 clones; estas tres formulaciones lograron una tasa de multiplicación mayor a 3X durante tres semanas, siendo el 68% de estos genotipos, variedades de zarzamora. El medio de Anderson

con o sin modificaciones mejoró la multiplicación de 34% de las accesiones, de las cuales el 94% son frambuesos rojos.

Cousineau y Donnelly (1991) cambiaron de medio sus explantes donadores cada tres o cuatro semanas sobre el mismo medio de iniciación. Stoevska et. al. (1995) emplearon los mismos medios utilizados en la etapa anterior. Bobrowski et. al. (1996) encontraron que la mayor proliferación de brotes para todos los cultivares probados, los medios que solo contenían BA (2 mg/L y 1 mg/L), difirieron significativamente del resto de tratamientos, en la prueba se demostró que la aplicación de ANA (0.1 mg/L) y AG₃ (0.5 mg/L) no incrementó la tasa de multiplicación de los brotes. La constancia en altas tasas de multiplicación fueron observadas en los cultivares ‘Guarany’ (12.3 brotes por explante, en el medio A) y ‘Ebano’ (7.2 brotes por explante en el medio C).

Gajdošová et. al. (2005) emplearon MS modificado con 1 mg/L de BAP y 0.1 mg/L de AIB. Isac (2005), MS con dosis de 1, 2 y 3 mg/L de BA con 0.1 mg/L de AIB, para probar el efecto coordinado con ácido ascórbico en dosis de 0, 25 y 50 mg/L, obteniéndose mejores resultados con 3mg/L de BA con 0.1 mg/L de AIB y 30 mg/L de ácido. Ostrolucká et. al. (2005) empleó medio MS con 1 mg/L de BAP y 0.1 mg/L de AIB.

Pesic-VanEsbroeck et. al. (2006) emplearon los medios MS y el de Anderson para frambueso rojo, mientras que para zarzamora, solamente el MS, con la inclusión de las dosis hormonales 1 mg/L de BA con 0.1 mg/L de AIB y de 0.1 mg/L de AG₃. Fueron realizados subcultivos cada tres a cuatro semanas. Para los explantes saludables pero con dificultad para multiplicarse, la dosis de BA fue incrementada a 2 mg/L, además demostraron que el medio de Anderson permitió la multiplicación de genotipos que no reaccionaron con el medio MS. Angelova y Arsov (2006) elaboraron medios 1/2 MS y MS con la inclusión de tres dosis de BA (0, 0.2 y 2 mg/L), habiendo observado que la formación inicial de yemas adventicias fue muy lenta, la cual se incrementó llegando a nueve por explante a partir del tercer subcultivo.

Minas y Neocleous (2007), lograron la formación de racimos de brotes de tres a cinco centímetros en un ciclo de seis a ocho semanas. Las plántulas fueron separadas y transferidas a medios frescos donde se desarrollaron por seis a ocho semanas más. En subcultivos

subsecuentes durante los siguientes seis meses, el número de plántulas incrementó sustancialmente. Un incremento del triple en la tasa de multiplicación fue logrado cada seis a ocho semanas con cada transferencia.

Clapa et. al. (2008) emplearon tres variantes de medio de cultivo: MS con 0.7 mg/L BAP, MS con 0.1 mg/L TDZ y el medio de propagación para plantas leñosas (WPM) con 1 mg/L de zeatina. La mayor tasa de multiplicación fue lograda con el tercer medio (7.138) siendo ligeramente superior que la que fue alcanzada por el primero (7.083), sin embargo, el precio de la zeatina es muy elevado, dificultando la viabilidad de su uso.

Jafari y Hamidoghli (2009) elaboraron MS enriquecido con diferentes combinaciones de BA (0, 2 y 3 mg/L), AG₃ (0, 0.2, 0.5 y 1 mg/L) y ácido ascórbico (100 mg/L). El mayor número de brotes fue obtenido por los medios MS conteniendo 2 mg/L de BA con las dosis 0.5 y 1 mg/L AG₃, mientras que el menor número fue producido con el medio MS sin reguladores y el medio conteniendo 0.2 mg/L de AG₃.

Wu et. al. (2009) realizaron cada seis semanas un subcultivo, los reguladores de crecimiento fueron BA, zeatina y AIB. Las concentraciones aplicadas a los medios fueron 4.56 µM de zeatina, o 4.65 µM de kinetina; 4.44, 8.87, 13.31 o 17.75 µM de BA; 0.49, 0.98, 1.48 o 2.46 µM de AIB. El carbón activado fue aplicado a los medios a una concentración de 0.05 por ciento (p/v).

Isac y Popescu (2009) utilizaron MS suplementado con 0.1 mg/L de AIB, 3 mg/L de BA y 50 mg/L de ácido ascórbico teniendo resultados favorables en la mayoría de variedades de frambuesa micro propagadas por ellos. En su trabajo, más de dos tercios de las variedades empleadas han tenido una tasa de multiplicación mayor a seis para tres subcultivos alcanzando un máximo de 41.92 brotes por explante inicial en la variedad 'Romy'. Jadán et. al. (2010) emplearon siete medios MS, uno sin hormonas, y seis con dos dosis de BAP (2 y 3 mg/L) con tres dosis de AIA (0.5, 0.75 y 1 mg/L), siendo el mejor tratamiento para la elongación de entrenudos el MS con 2 mg/L de BAP y 0.75 mg/L de AIA. Vujović et. al. (2010) utilizaron MS con 1 mg/L de BAP, 0.1 mg/L de AIB y de AG₃ para tener un stock de plántulas donadoras,

subcultivadas cada tres semanas. Amalia et. al. (2014) después de 30 días de subcultivo separó los brotes que poseían de dos a cinco centímetros de largo, removieron las hojas y los segmentos de tallo de tres a cinco centímetros de longitud fueron transferidos al mismo medio de iniciación, los subcultivos se realizaron en intervalos de 30 días, incrementándose la tasa de multiplicación, después de 45 días los explantes estaban listos para ser enraizados.

2.2.3. Enraizamiento

Es la preparación de las plántulas para su establecimiento en el suelo, para ello, las partes aéreas producidas son transferidas a medio que permita la rizogénesis. Este proceso se puede dividir en inducción, iniciación y elongamiento de raíces, las dos primeras a veces consideradas como una sola responden o dependen de la adición de auxina en el medio de cultivo, donde el crecimiento y elongamiento de las raíces es estimulado por la presencia de dicha hormona. (Aguirre et. al. 2010)

El medio de cultivo también tiene una gran influencia en esta fase. Grattapaglia citado por Aguirre et. al. (2010), afirma que las partes aéreas requieren de auxinas exógenas para promover la rizogénesis, aunque la presencia de residuos de citoquininas pueden dificultar este proceso. Las auxinas más comúnmente utilizadas son el ácido indolbutírico (AIB), naftalenacético (ANA) y el indolacético (AIA). Otros compuestos son empleados para promover la rizogénesis además de las auxinas: el carbón activado, los compuestos fenólicos y el phloroglucinol (PG).

Las condiciones de incubación, temperatura y la humedad, son semejantes a las adoptadas durante la multiplicación, alterándose principalmente el régimen de luz, para ello las partes aéreas deben someterse a intensidades de luz reducidas o al oscuro absoluto durante algunos días, correspondiendo a la fase de inducción o iniciación.

Reed (1990) empleó MS libre de hormonas para enraizamiento, sin embargo la capacidad de enraizamiento no fue probada en todas las 256 accesiones de *Rubus*. Stoevska et. al. (1995) emplearon dos medios MS y 1/2 MS cada uno a tres concentraciones de AIB (0.5, 1 y 2 mg/litro), siendo el medio óptimo 1/2 MS con 0.5 mg/L de AIB que permitió el enraizamiento de 100 por ciento en 'Shopska Alena' y 93.3 en 'Samodiva', además de un mayor número y longitud de raíces. Encontraron que las dosis mayores a 2, causa formación de callos no

deseados además de una reducción en el enraizamiento. Bobrowski et. al. (1996) emplearon brotes de dos centímetros de longitud como explantes iniciales, empleó 1/3 MS con tres dosis de AIB (0.3, 0.5 y 0.8) sembrando seis explantes por cada frasco. Después de 45 días se determinó que las tres dosis permiten un 100 por ciento de enraizamiento en todas las variedades.

Hughes et. al. (2004) utilizaron medios con y sin carbón activado, adicionados con AIB a cinco dosis: 0.1, 0.5, 1, 2 y 3 mg/L. La adición del carbón incrementó significativamente el porcentaje de plantas enraizadas, además el porcentaje de enraizamiento fue el más alto a los tres niveles más bajos de AIB. Mészáros et. al. (2005) utilizaron MS libre de hormonas. Ostrolucká et. al. (2005) emplearon MS con 1mg/L de AIB.

Pesic-VanEsbroeck et. al. (2006) manifiestan que para *R. idaeus*, el carbón activado es esencial para el enraizamiento, además de que el AIB es importante para el crecimiento, mas no para la rizogénesis. Para frambueso, emplearon el medio de Anderson más 600 mg/L de carbón activado y 1mg/L de AIB. En el caso de plántulas de zarzamora, emplearon a dos medios MS, uno sin hormonas y otro con 10 µM de AIB por una semana y luego a un medio sin hormonas por tres semanas. Minas y Neocleous (2007) emplearon medios MS sin hormonas, enraizando después de ocho a diez semanas y obtuvieron un sistema radicular bien formado. Clapa et. al. (2008) emplearon un medio MS libre de hormonas y después de seis semanas se produjo el enraizamiento.

Wu et. al. (2009), obtuvieron enraizamiento durante la etapa de multiplicación, sin embargo los brotes que no presentaron este fenómeno se vieron beneficiados con la adición de AIB, reducción de intensidad luminosa, la adición de carbón activado y/o la reducción a la quinta parte de la concentración del medio MT. Los medios de enraizamiento probados consistieron en 1/5 MT con 0.49 a 0.98 µM de AIB o duplicar la dosis a 1.48 a 2.46 µM, si fuese necesario. La formación de raíces en frambueso rojo y negro se logró eficientemente con la dosis duplicada de AIB, 11 días después del cultivo. Isac y Popescu (2009) emplearon 1/2 MS suplementado con tres dosis de AIB (0.5, 1 y 2 mg/L) además de 0 ó 162 mg/L de PG. En el medio suplementado con 2 mg/L de AIB y PG, el enraizamiento fue de 69.9 por ciento en 'Willamette' hasta el 100 por ciento en las variedades 'Heritage' y 'Bulgarsky Rubin'. Además determinaron

que en la ausencia de AIB, o su presencia a una baja concentración (0.5 a 1 mg/L), el PG no afecta en la habilidad de enraizamiento de los brotes de frambuesa.

Jafari y Hamidoghli (2009) emplearon brotes mayores a un centímetro, para ello elaboraron medios MS con cuatro diferentes concentraciones de AIB (0, 0.5, 1 y 2 mg/L), realizando cambios de medio cada dos semanas. La concentración de 2 mg/L de AIB otorgó un mayor número de raíces (4) y una longitud radicular superior (7.83 cm).

Cheong et. al. (2014) emplearon brotes de tres centímetros a más, empleando MS libre de hormonas. Las plántulas fueron mantenidas bajo luz de poca intensidad durante una semana, luego fueron transferidas a condiciones de luz regular, produciéndose el enraizamiento cuatro a ocho semanas después. Amalia et. al. (2014) empleó MS reducido a la mitad suplementado con 1 mg/L de IBA, después de 45 días los explantes enraizados fueron removidos. Robres-Torres et. al. (2015) utilizaron sales MS al 50 por ciento de su concentración, con la adición de 15 a 20 g/L de sacarosa al medio, sin hormonas.

2.2.4. Aclimatación:

La etapa de trasplante involucra la transferencia de las plantas *in vitro* a condiciones *in vivo* en invernadero, este proceso es sumamente importante pues determina el éxito o el fracaso de todo el cultivo de tejidos. Las plántulas *in vitro* enraizadas son muy sensibles a los cambios ambientales por ello son seleccionadas y trasladadas a un invernadero, allí se las retira de sus recipientes y son sometidas a un lavado con agua para retirar los residuos de medio de cultivo. Estas plántulas deben ser desinfectadas con una solución débil de fungicida, normalmente Benomil al 0,2 por ciento (p/v) empleado por Minas y Neocleous (2007), para su posterior establecimiento en sustrato estéril.

Según Grattapaglia y Machado citados por Aguirre et. al. (2010), es bastante crítica y representa, en algunos casos un factor limitante en el proceso de micropropagación, debido a la susceptibilidad al estrés hídrico generada por un ambiente que exige un incremento en la tasa de transpiración. Por esta razón, el trasplante es realizado en ambientes con una humedad relativa alta, por lo que las bandejas o camas de aclimatación son cubiertas con plástico. Además, son susceptibles al ataque de microorganismos saprófitos y eventualmente patogénicos

Stoevska et. al. (1995) trasplantaron las plántulas en forma de racimos para facilitar el proceso de transporte y manejo. La tasa de sobrevivencia de las plantas en macetas alcanzó un porcentaje de 95 por ciento, después de 45 días en invernadero las plantas alcanzaron una altura de 10 centímetros. PesicVanEsbroeck et. al. (2006) transfirieron las plántulas de frambuesa y zarzamora en bandejas almacigueras de 38 celdas conteniendo sustrato MetroMix y sometidas a nebulización intermitente por dos semanas. Las plantas fueron mantenidas por 68 semanas en invernadero a temperaturas de 24 a 27°C y un fotoperiodo de 9 a 14 horas.

Minas y Neocleous (2007) sembraron las plantas de tres a cinco centímetros en macetas conteniendo musgo estéril, para luego ser colocadas en un invernadero bajo sombra donde la temperatura no excedió los 29°C. Después de tres semanas, la tasa de sobrevivencia fue de 95 por ciento, las plantas alcanzaron un tamaño promedio de 10 centímetros luego de 45 días en el invernadero. Clapa et. al. (2008) emplearon macetas con perlita como sustrato, determinando un porcentaje de sobrevivencia superior al 90 por ciento. Wu et. al. (2009) emplearon bolsas para vivero conteniendo una mezcla de corteza y piedra pómez en proporción seis a cuatro, donde sembraron las plantas y fueron regadas bajo niebla intermitente en invernadero durante dos semanas. Luego fueron llevadas a aclimatación bajo riego por goteo, logrando una tasa de sobrevivencia superior al 98 por ciento.

Jafari y Hamidoghli (2009) emplearon contenedores plásticos con turba estéril y perlita en proporción uno a uno, donde cubrieron las plantas bajo vasos de vidrio, para ser gradualmente expuestas a condiciones normales de invernadero. Después de tres semanas de endurecimiento, las sobrevivientes (85 por ciento) fueron trasplantadas a macetas.

Vujović et. al. (2010) emplearon macetas de plástico con turba estéril, las plantas fueron colocadas bajo riego por nebulización durante dos semanas en el invernadero. Cheong et. al. (2014) trasplantaron las plantas a recipientes con suelo, para luego ser cubiertas con vasos de plástico claro y mantenidas en una cámara de crecimiento a 22°C con un fotoperiodo de 16 horas. Después de seis semanas, las plantas aclimatadas fueron transferidas al invernadero y fueron mantenidas allí por dos meses. Amalia et. al. (2014) emplearon musgo más vermiculita (1:1 v/v) como sustrato, las vitro - plantas fueron llevadas a cámara de crecimiento a 23±2°C y protegidas con cubiertas de plástico, fueron gradualmente acostumbradas a la humedad del

ambiente. Después de tres semanas, las plantas pasadas a macetas para ser colocadas en invernadero expuesto a 10 a 12 horas de luz y a 22 a 25°C con humedad relativa de 50 a 65 por ciento, obteniendo una sobrevivencia del 95 por ciento.

Las plantas deben pasar a una condición autotrófica además de requerir de la absorción de sales, para así poder efectuar la fotosíntesis y sobrevivir. PesicVanEsbroeck et. al. (2006) emplearon un fertilizante líquido 20-20-20, que era aplicado una vez por semana a sus plantas en el invernadero. Minas y Neocleous (2007) aplicaron una solución nutritiva conteniendo nitrógeno, fósforo, potasio y otros microelementos. Las plantas aclimatadas permanecerán en estas condiciones antes de su trasplante a campo definitivo, habiendo de esta forma terminado la propagación *in vitro* de los genotipos de *Rubus*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. MEDIO DE CULTIVO

Según las experiencias revisadas en la bibliografía para el cultivo de las especies de *Rubus*, se utilizó el medio Murashige & Skoog (MS), detallado en el siguiente cuadro:

Tabla 1. Composición de las sales del Medio Murashige & Skoog (1962)

Compuesto	Fórmula Química	Dosis (mg/L)
MACRONUTRIENTES		
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	1650
Nitrato de potasio	KNO ₃	1900
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	440
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	170
MICRONUTRIENTES		
Ioduro de potasio	KI	0.83
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6.2
Sulfato de manganeso tetrahidratado	MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
Molibdato de sodio dihidratado	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
Cloruro de cobalto hexahidratado	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025

Se incluyeron en la formulación del medio el quelato EDTA de hierro y sodio (FeNaEDTA) a 40 mg/L, los aminoácidos: glicina (2 mg/L), ácido nicotínico, piridoxina (0.5 mg/L) y tiamina (0.1 mg/L), myo inositol (100 mg/L) y azúcar (30 g/L). Este medio fue ajustado para *Rubus* a un pH de 5.8 y suplementado con agar-agar de la marca Sigma (5 g/L) para obtener un medio sólido

3.1.2. MATERIAL VEGETAL

Se emplearon 6 plantones de frambueso rojo (*Rubus idaeus* L.) y 6 plantones de zarzamora (*Rubus fruticosus* L.) provenientes del vivero 'Los Inkas', fueron escogidos los que tenían más de cinco hijuelos en desarrollo indicando que en ese momento presentaron un alto vigor. Las plantas madres fueron sembradas en una cama preparada de 16 m² ubicada en las parcelas experimentales del Programa de Cereales de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Se esperó a que las plantas fructifiquen para que, después de la colecta de frutos emerjan las nuevas primocañas y así utilizarlos como plantas donadoras de explantes.

3.1.3. MATERIALES ADICIONALES

- a. Hormonas: bencilaminopurina (BAP), thidiazuron (TDZ) y ácido indolbutírico (AIB).
- b. Sustancias desinfectantes: Lejía Clorox (hipoclorito de sodio al 4%), Cloruro de mercurio, detergente en polvo, Benomil, alcohol etílico, Tween20.
- c. Insumos: Hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, agua destilada, gel desinfectante, carbón activado.
- d. Materiales de laboratorio: Tubos de ensayo, frascos de vidrio, placas Petri, pinzas, bisturíes, mechero Bunsen, algodón, papel aluminio, plástico film, probetas, buretas, picetas, fiolas, vasos de precipitado, matraces, papel toalla.
- e. Materiales para la aclimatación: Musgo, perlita, vermiculita, vasos de plástico descartables, bandejas de plástico.

3.1.4. EQUIPO DE LABORATORIO

Cámara de flujo laminar, horno microondas, refrigeradora, agitador magnético, balanza de precisión, pH metro.

3.2. VARIABLES DE EVALUACIÓN

3.2.1. ETAPA DE DESINFECCIÓN

- a. Porcentaje de Regeneración: Se evaluó si las yemas se habían abierto mostrando una yema central activa dispuesta sobre el eje y con presencia de hojas a dispuestas a modo de roseta protegiéndola. Se obtuvo al dividir el número de explantes vivos y brotados entre el total de explantes multiplicado por 100.

- b. Porcentaje de Oxidación: Reacción de los explantes ante cualquier daño mecánico o de naturaleza química, causando la liberación de radicales libres que cambian de color al explante a negro total o parcialmente, llegando a causar su muerte. Se calculó al dividir el número de explantes oxidados entre el total de explantes multiplicado por 100.
- c. Porcentaje de Fenolización: Consistió en el cambio de color del medio de cultivo producto de la liberación de sustancias fenólicas a partir del explante, como respuesta a agentes inductores de estrés. Se obtuvo al dividir el número de explantes con medio fenolizado entre el total de explantes, multiplicado por 100. La oxidación y la fenolización son reacciones antagónicas a la regeneración.
- d. Porcentaje de Contaminación por Hongos: Se obtuvo al dividir el número de explantes que presentaron micelio sobre sí mismo o en el medio de cultivo, entre el total de explantes, por 100.
- e. Porcentaje de Contaminación por Bacterias: Se manifestó como una secreción de un mucílago generalmente blanquecino desde la base del explante, llegó a cambiar el color del medio, y originó un mal olor dentro del frasco y habiendo causado la muerte de muchas plántulas. Se obtuvo como una razón porcentual entre los explantes con presencia de bacterias y el total.

3.2.2. ETAPA DE ESTABLECIMIENTO

- a. Porcentaje de Regeneración: Se evaluó de la misma forma que en la desinfección, solo que los datos fueron tomados durante un mes y se observaron las respuestas ligadas al efecto de las hormonas.
- b. Porcentaje de Oxidación: Fue evaluado con el mismo criterio que en la desinfección, la dosis hormonal que cause el mayor grado de oxidación fue descartada.
- c. Longitud de brotes por explante: Con un vernier se midió el tamaño del eje del brote de mayor longitud de entre todos los que se formaron a partir del explante.
- d. Número de brotes por explante: Se contabilizó el número de brotes desarrollados sobre los puntos de crecimiento en cada explante.

3.2.3. ETAPA DE ENRAIZAMIENTO

- a. Porcentaje de Enraizamiento: Se realizó el conteo de cuantos brotes formaron raíces, dividido entre el total de brotes sembrados, después de un mes de haber sido cultivados en los medio de enraizamiento.
- b. Longitud de raíces por brote: Se seleccionaron 4 raíces al azar de cada siembra y se obtuvo el promedio por cada uno de los brotes, indicando un tamaño referencial.

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL:

Para establecer este protocolo se establecieron tres etapas: Desinfección, Establecimiento y Enraizamiento. Cada una de ellas con factores y variables de evaluación distintos.

En las tres etapas se empleó el Diseño de Bloques Completamente al Azar con arreglo factorial, el cual es diferente en cada una de ellas: en la Etapa de Desinfección y de Establecimiento fue 2A3B5C y en la de Enraizamiento, 2A2B3C.

3.3.1. MODELO ADITIVO LINEAL:

El modelo aditivo lineal tuvo la misma estructura para las tres etapas del protocolo:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \epsilon_{ijkl}$$

La interpretación de cada componente varía de acuerdo a la etapa, como se puede observar en el siguiente cuadro:

Tabla 2. Elementos del modelo aditivo lineal para cada fase del protocolo

ELEMENTOS	DESINFECCIÓN	ESTABLECIMIENTO	ENRAIZAMIENTO
Y_{ijkl}	Valor de la variable, para la i-ésima especie del género <i>Rubus</i> , empleando el j-ésimo tipo de explante, sometido al k-ésimo tratamiento de desinfección para la l-ésima repetición.	Valor de la variable, para la i-ésima especie empleando el j-ésimo tipo de explante, sembrado sobre el k-ésimo medio de establecimiento para la l-ésima repetición.	Valor de la variable, para la i-ésima especie, sembrada sobre el j-ésimo medio de cultivo, sometida a la k-ésima dosis de ácido indolbutírico para la l-ésima repetición.
μ	Media general de la respuesta		
α_i	Efecto de la i-ésima especie del género <i>Rubus</i> , siendo $i=1,2$		
β_j	Efecto del j-ésimo tipo de explante, siendo $j=1,2,3$		Efecto del j-ésimo medio de cultivo, siendo $j=1,2$
γ_k	Efecto del k-ésimo tratamiento de desinfección, siendo $k=1,2,3,4,5$	Efecto del k-ésimo medio de establecimiento, siendo $k=1,2,3,4,5$	Efecto k-ésima dosis de ácido indolbutírico, siendo $k=1,2,3$
$(\alpha\beta)_{ij}$	Efecto de la i-ésima especie del género <i>Rubus</i> empleando el j-ésimo tipo de explante.		Efecto de la i-ésima especie del género <i>Rubus</i> sembrada sobre el j-ésimo medio de cultivo.
$(\alpha\gamma)_{ik}$	Efecto de la i-ésima especie del género <i>Rubus</i> sometido el k-ésimo tratamiento de desinfección.	Efecto de la i-ésima especie del género <i>Rubus</i> sembrada sobre el k-ésimo medio de establecimiento.	Efecto de la la i-esima especie, sembrada sobre el j-ésimo medio de cultivo, sometida a la k-ésima dosis de ácido indolbutírico
$(\beta\gamma)_{jk}$	Efecto del j-ésimo tipo de explante sometido eal k-ésimo tratamiento de desinfección.	Efecto del j-ésimo tipo de explante sembrado sobre el k-ésimo medio de establecimiento.	Efecto del j-ésimo medio de cultivo suplementado con la k-ésima dosis de ácido indolbutírico
$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$	Efecto de la i-ésima especie del género <i>Rubus</i> , con el j-ésimo tipo de explante y el k-ésimo tratamiento de desinfección.	Efecto de la i-esima especie empleando el j-ésimo tipo de explante, sembrado sobre el k-ésimo medio de establecimiento	Efecto de la la i-esima especie, sembrada sobre el j-ésimo medio de cultivo, sometida a la k-ésima dosis de ácido indolbutírico
ϵ_{ijkl}	Efecto del error aleatorio para la i-esima especie del género <i>Rubus</i> , con el j-ésimo tipo de explante, sujeto al k-ésimo tratamiento de desinfección para la l-ésima repetición.	Efecto del error aleatorio para la i-esima especie empleando el j-ésimo tipo de explante, sembrado sobre el k-ésimo medio de establecimiento para la l-ésima repetición.	Efecto del error aleatorio para la i-esima especie, sembrada sobre el j-ésimo medio de cultivo, sometida a la k-ésima dosis de ácido indolbutírico para la l-ésima repetición.

3.3.2. TRATAMIENTOS:

En el Tabla 3 se detallan los niveles de los factores en estudio para las etapas del protocolo.

Tabla 3. Niveles de los factores en estudio para las tres fases de la micropropagación *in vitro* de *Rubus*

ETAPA DE DESINFECCIÓN (2A3B5C)		
FACTOR A: ESPECIE DEL GÉNERO <i>Rubus</i>	FACTOR B: TIPO DE EXPLANTE	FACTOR C: TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN
A1. Frambueso rojo A2. Zorzamora	B1: Ápice caulinar B2: Yema axilar B3: Segmento de hoja	C1: T1 (10 minutos en solución de lejía al 15%) C2: T2 (20 minutos en solución de lejía al 15%) C3: T3 (10 min. en sol. de lejía al 15% + 1 min. en etanol al 70%) C4: T4 (20 min. en sol. de lejía al 15% + 1 min. en etanol al 70%) C5: T5 (10 minutos en solución al 1% de HgCl ₂)
ETAPA DE ESTABLECIMIENTO (2A3B5C)		
FACTOR A: ESPECIE DEL GÉNERO <i>Rubus</i>	FACTOR B: TIPO DE EXPLANTE	FACTOR C: MEDIO DE ESTABLECIMIENTO
A1. Frambueso rojo A2. Zorzamora	B1: Ápice caulinar B2: Yema axilar B3: Segmento de hoja	C1: M1 (MS + 1 mg/L de BAP) C2: M2 (MS + 2 mg/L de BAP) C3: M3 (MS + 1 mg/L de TDZ) C4: M4 (MS + 2 mg/L de TDZ) C5: M5 (MS)
ETAPA DE ENRAIZAMIENTO (2A2B3C)		
FACTOR A: ESPECIE DEL GÉNERO <i>Rubus</i>	FACTOR B: MEDIO DE CULTIVO	FACTOR C: DOSIS DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO
A1. Frambueso rojo A2. Zorzamora	B1: MS B2: ½ MS	C1: 0 mg/L C2: 0.5 mg/L C3: 1 mg/L

En todas las etapas del protocolo se usaron seis repeticiones, cada una constituida por cinco tubos de ensayo conteniendo un explante (desinfección y establecimiento) o un brote de 4 centímetros de longitud (enraizamiento). Para las dos primeras etapas se formularon 30 tratamientos obteniendo un total de 180 unidades experimentales, mientras que para la fase de enraizamiento se formularon 12 tratamientos obteniendo 72 unidades experimentales.

3.4. PROCEDIMIENTO:

3.4.1. PREPARACIÓN DE EXPLANTES:

Se cortaron cañas de frambuesa y zarzamora de 1 a 1.50 metros de longitud en pleno crecimiento vegetativo con ayuda de una podadora desinfectada a una altura de 30 centímetros del nivel del suelo. Dentro del laboratorio se realizó la selección de los explantes como se detalló en el acápite anterior, fueron almacenados en papel humedecido hasta su desinfección.

Se seleccionaron tres tipos:

- a. **Ápice caulinar:** Se tomaron las puntas de los extremos de las primocañas de las dos especies de *Rubus*. El explante contuvo a la yema apical rodeada por sus primordios y a la primera hoja en desarrollo que aún no se ha desplegado.
- b. **Yemas axilares:** Se tomaron secciones de primocañas en pleno crecimiento, cada segmento presentará 4 centímetros de longitud y conteniendo una yema, retirando la vaina que une a la hoja con la caña. Estos explantes se tomaron del tercio medio, descartando las primeras cuatro yemas por debajo de la yema apical, y las cinco últimas de la base de la caña.
- c. **Segmentos de hoja:** Segmentos de 4 cm², tomados de las 2 hojas más superiores completamente desplegadas, ubicadas por debajo de las yemas apicales. Las hojas recibieron tres cortes transversales en el raquis del envés después de ser desinfectadas para absorber a los elementos del medio de cultivo.

3.4.2. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Para la primera prueba, la desinfección, se preparó un medio de cultivo Murashige y Skoog cuya composición se detalla en el punto 4.1.1., este medio no tuvo hormonas, puesto que sólo se quiso ver el efecto de los agentes desinfectantes sobre los explantes. Se preparó 5 litros de medio y fue distribuido en tubos de ensayo conteniendo 5 mililitros, los que se almacenaron por una semana para descartar aquellos que se observen contaminados.

3.4.3. DESINFECCIÓN

Para la prueba de desinfección se emplearon 6 repeticiones por tratamiento, cada una formada por cinco tubos de ensayo conteniendo un único explante. Los explantes se lavaron con agua corriente y detergente en polvo, para luego ser enjuagados con agua destilada. A continuación fueron sumergidos por 10 minutos en una solución de fungicida Benomil a 1 g/L y un poco de detergente. Al finalizar, los explantes recibieron un último enjuague para luego ser expuestos a los tratamientos de desinfección.

Los cuatro primeros (T1 a T4) emplearon una solución de lejía comercial al 15% mezclada con 5 gotas de Tween20. En los tratamientos T1 y T3 los explantes se sumergieron por 10 minutos, mientras que en T2 y T4 la inmersión se dio por 20 minutos, además T3 y T4 tuvieron un pretratamiento con una solución de etanol al 70% por un minuto. Mientras que en el quinto se sumergieron los explantes por 10 minutos en una solución de cloruro de mercurio (1 g/L) mezclada con 5 gotas de Tween20.

En la cámara de flujo laminar, se procedió a realizar la siembra de los explantes, la base del ápice caulinar se seccionó con el bisturí, de la misma forma que la base del nudo del explante axilar. En el caso de los segmentos de hoja, se hicieron unas incisiones transversales en el raquis de la hoja por el envés. Las zonas de corte fueron puestas en contacto con el medio de cultivo con ayuda de la pinza, para luego esterilizar el tubo con fuego y sellarlo con plástico film.

Se evaluó cada semana durante un mes para observar la presencia de hongos y bacterias, las cuales aparecen desde los cuatro días hasta la segunda semana después de la siembra.

3.4.4. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO DE ESTABLECIMIENTO

Para el inicio de la micropropagación se utilizó el medio MS suplementado con cinco variaciones hormonales, cuatro de ellos con dos citoquininas: el BAP y el TDZ ambas a dos dosis (1 y 2 mg/L) y un quinto tratamiento libre de hormonas. Se preparó medio litro de medio por cada tratamiento y fue dispensado en 50 tubos de ensayo cada uno conteniendo 10 mililitros y fueron puestos a gelificar para iniciar la siembra la siguiente semana. Todos los medios fueron ajustados a un pH de 5.8 y autoclavados a una presión de 1 atm y a una temperatura de 121 °C.

3.4.5. SIEMBRA DE EXPLANTES

Los medios de cultivo y los explantes fueron llevados a la cámara de flujo laminar para realizar la siembra, siguiendo el mismo protocolo empleado para la etapa de desinfección

Los cultivos fueron llevados a la cámara de incubación donde fueron evaluados durante un mes hasta el desarrollo de las yemas y la formación de brotes. Después de la recopilación de datos, se realizó un cambio de medio transfiriendo los explantes ya desarrollados se a un medio MS con 1 g/L de carbón activado y sin hormonas, esto provocó un crecimiento acelerado de los brotes y un mayor desarrollo de las hojas.

3.4.6. MULTIPLICACIÓN

Luego de evaluar el desarrollo de los diferentes explantes se determinó que las yemas axilares son los explantes ideales y se trabajó solamente empleando los brotes obtenidos a partir de ellos para las siguientes fases del experimento. Un mes después del cambio de medio, los brotes fueron retirados de los tubos de ensayo, donde fueron separados del nudo del tallo que portaba a la yema axilar y se sembraron sobre el mejor medio de la etapa de establecimiento, el M1, esta vez suplementado con 1 mg/L de carbón activado.

Durante esta fase se realizaron dos cambios de medio mensuales y en cada uno de ellos se observó el desarrollo de un callo oscuro en la base el cual generó brotes con una tasa de multiplicación constante de 5X. Se observó también que este tratamiento logró un incremento en el número de yemas, en su longitud y en el tamaño de sus hojas.

3.4.7. ENRAIZAMIENTO

Después de dos meses de multiplicación, los brotes habían duplicado su tamaño y poseían un tallo diferenciado con hojas. Fueron separados de los callos e individualizados, se escogieron 180 brotes de cada variedad de un tamaño uniforme (4 ± 0.5 centímetros) para ser sembrados en los medios de enraizamiento, se prepararon dos, un MS completo y uno formulado con la mitad de la concentración salina (1/2 MS). Para cada uno se formularon tres variaciones, una libre de hormonas y otras con dos dosis de AIB (0.5 y 1 mg/L) todas ellas suplementadas con 1 g/L de carbón activado para reducir la intensidad luminosa y promover la rizogénesis.

Los brotes se desarrollaron en este medio durante un mes, pasado este tiempo se observó el desarrollo de raíces y un ligero incremento en el tamaño del brote, indicando que ya estaban listos para ser aclimatados

3.4.8. ACLIMATACIÓN

El sustrato de aclimatación estuvo compuesto por tres partes iguales en volumen de musgo desmenuzado, perlita y vermiculita. Los tres elementos se mezclaron uniformemente con la adición de agua destilada y luego fueron separados en vasos de plástico con orificios en sus bases para drenar el agua excedente del riego.

Las plántulas fueron retiradas del medio de enraizamiento con ayuda de una pinza y con mucha delicadeza se tomaron evitando que se rompan las raicillas, fueron sumergidas en una solución desinfectante de Benomil (1 g/L) por cinco minutos y se mantuvieron húmedas hasta su siembra. Al finalizar, fueron cubiertas con vasos plásticos y se almacenaron en la cámara de crecimiento durante un mes, al cabo de ese tiempo se logró que el 80 por ciento de las plántulas de frambuesa y el 95 por ciento de las de zarzamora sobrevivieran, mostrando un cambio en las hojas, observándose el desarrollo de las nervaduras y la presencia de tricomas y espinas en el tallo. Tomando este cambio como un indicio de que las plantas estaban listas para respirar por sí mismas, los vasos fueron retirados y después de dos semanas fueron trasladadas al invernadero bajo una sombra del 50 por ciento, la cual se fue retirando hasta lograr una planta completamente funcional y de vida independiente. Durante todo este proceso las plántulas fueron fertilizadas con una solución hidropónica formada por las sales y vitaminas del medio MS.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. ETAPA DE DESINFECCIÓN

4.1.1. PORCENTAJE DE REGENERACIÓN

El resultado del análisis estadístico muestra diferencias significativas entre los tipos de explante y tratamientos de desinfección a un nivel de significancia de 0.05 (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de varianza del porcentaje de regeneración en la etapa de desinfección

F. V.	G.L.	S.C.	C.M.	F-cal	p-VALOR	Significancia
Bloques	5	26.99	5.40	3.88	0.002	***
Especie	1	0.13	0.13	0.09	0.75	NS
Explante	2	615.30	307.65	220.96	0.0001	****
Desinfección	4	23.89	5.97	4.29	0.0026	***
Esp. X Exp.	2	0.07	0.04	0.03	0.97	NS
Exp. X Des.	8	19.28	2.41	1.73	0.095	NS
Esp. X Des.	4	0.20	0.05	0.04	0.99	NS
Exp. X Esp. X Des.	8	0.60	0.08	0.05	0.99	NS
ERROR	145	201.89	1.39234483			
TOTAL	179	888.35				CV:20.62

($\alpha= 0.05$)

Se confirma estadísticamente (Figura 1) que la yema axilar es el explante que logra el mayor porcentaje de regeneración (49.33 por ciento), seguido de la ápice caulinar (33.33 por ciento), en ambos se pudo observar el desarrollo de hojas y la emergencia de la yema después de siete días de la siembra. En el caso de los segmentos de hojas (0.33 por ciento), solo se observó una multiplicación de tejido mas no la aparición de brotes.

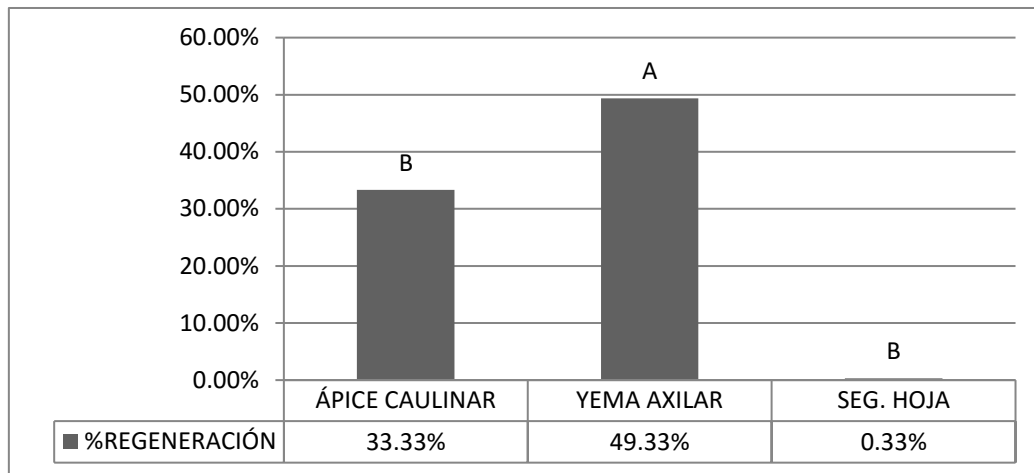


Figura 1: Respuesta en porcentaje de regeneración de los diferentes tipos de explantes en la etapa de desinfección.

En la Figura 2 se aprecia el porcentaje de explantes regenerados al ser sometidos a los cinco tratamientos, donde el T5 (35.55 por ciento), seguido por T2 (30 por ciento), T4 (26.67 por ciento), T1 (25.55 por ciento) y por último el tratamiento T3 (20.55 por ciento).

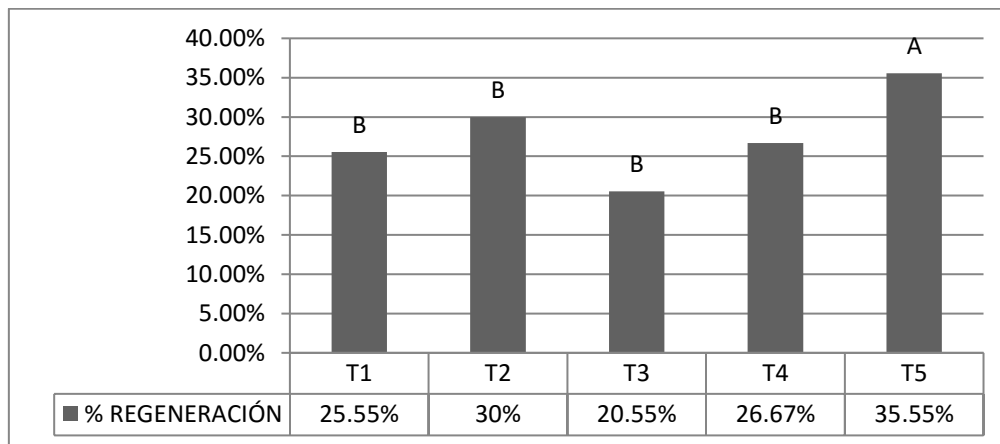


Figura 2: Respuesta en porcentaje de regeneración de los diferentes tratamientos de desinfección.

4.1.2. PORCENTAJE DE OXIDACIÓN

Según al análisis de varianza general del porcentaje de oxidación se aprecia que el tipo de explante y tratamiento de desinfección presentan diferencias significativas a un nivel de significancia de 0.05 (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de varianza del porcentaje de oxidación en la etapa de desinfección

F. V.	G.L.	S.C.	C.M.	F-cal	p-VALOR	Significancia
Bloques	5	15.42	3.08	3.18	0.009	***
Especie	1	1.50	1.50	1.55	0.21	NS
Explante	2	128.03	64.02	66.06	0.0001	****
Desinfección	4	21.67	5.42	5.59	0.0003	***
Esp. X Exp.	2	4.64	2.32	2.39	0.09	NS
Exp. X Des.	8	14.02	1.75	1.81	0.08	NS
Esp. X Des.	4	0.26	0.07	0.07	0.99	NS
Exp. X Esp. X Des.	8	2.17	0.27	0.28	0.97	NS
ERROR	145	140.51	0.96903448			
TOTAL	179	328.22				

CV:11.31

($\alpha = 0.05$)

Los resultados obtenidos para el factor tipo de explante (Figura 3) muestran que en los segmentos de hoja se dio el mayor porcentaje de oxidación (86 por ciento), seguido de los ápices caulinares (66 por ciento) y finalmente de las yemas axilares (50.66 por ciento).

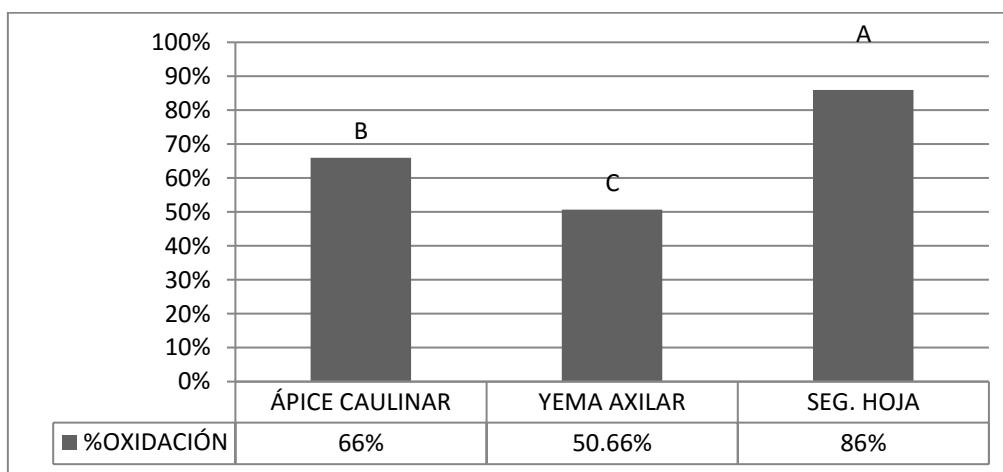


Figura 3: Respuesta en porcentaje de oxidación de los diferentes tipos de explantes en la etapa de desinfección

En la Figura 4 se muestra el porcentaje de oxidación en respuesta a los tratamientos de desinfección, siendo T3 el causante de la mayor oxidación (75.55 por ciento), seguido por los tratamientos T4 (71.66 por ciento), T1 (66.11 por ciento), T2 (65 por ciento) y finalmente con T5 (59.44 por ciento).

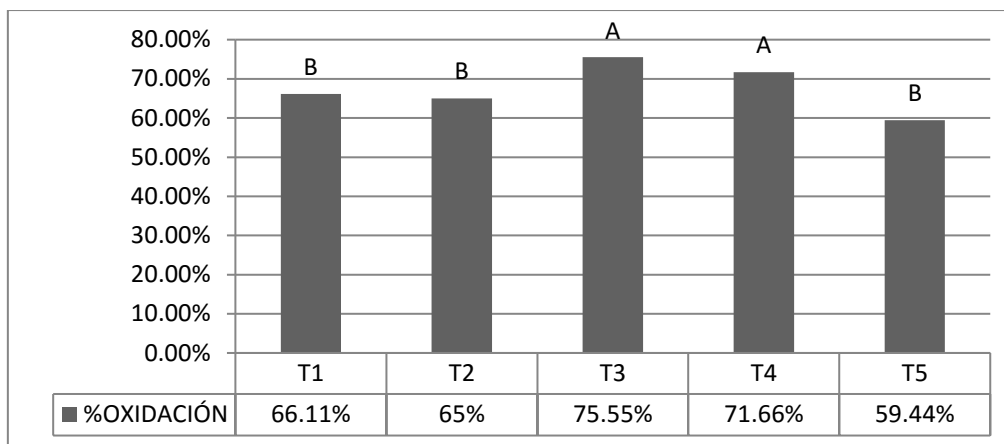


Figura 4: Respuesta en porcentaje de oxidación a los tratamientos de desinfección.

4.1.3. PORCENTAJE DE FENOLIZACIÓN

Según al resultado del análisis estadístico, se muestran diferencias significativas entre las fuentes tipo de explante, tratamiento de desinfección y la interacción tipo de explante – tratamiento de desinfección, a un nivel de significancia de 0.05 (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de varianza del porcentaje de fenolización en la etapa de desinfección

F. V.	G.L.	S.C.	C.M.	F-cal	p-VALOR	Significancia
Bloques	5	18.30	3.66	2.33	0.05	NS
Especie	1	0.00	0.00	0.00	0.96	NS
Explante	2	24.93	12.47	7.93	0.0005	***
Desinfección	4	76.91	19.23	12.23	0.0001	****
Esp. X Exp.	2	0.14	0.07	0.04	0.05	NS
Exp. X Des.	8	97.97	12.25	7.79	0.0001	****
Esp. X Des.	4	0.22	0.06	0.03	0.99	NS
Exp. X Esp. X Des.	8	2.17	0.27	0.17	1	NS
ERROR	145	228.05	1.57275862			
TOTAL	179	448.69				CV:25.32

($\alpha = 0.05$)

La respuesta a los tipos de explante que se observan en la Figura 5, se da un mayor porcentaje de fenolización en las yemas axilares (21.33 por ciento), seguido por los segmentos de hoja (16.33 por ciento) y los ápices caulinares (13.33 por ciento).

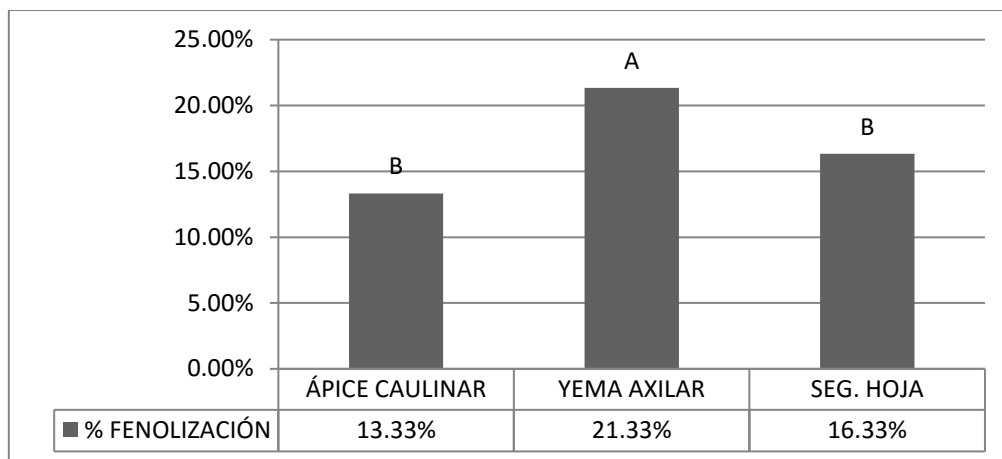


Figura 5: Respuesta en porcentaje de fenolización en los diferentes tipos de explantes.

En la Figura 6 se puede apreciar la respuesta a los tratamientos de desinfección, el T1 obtuvo el mayor porcentaje de fenolización (27.77 por ciento), seguido de T2 (19.44 por ciento), T3 (18.88 por ciento), T4 (11.11 por ciento) y finalmente por el T5 (7.77 por ciento).

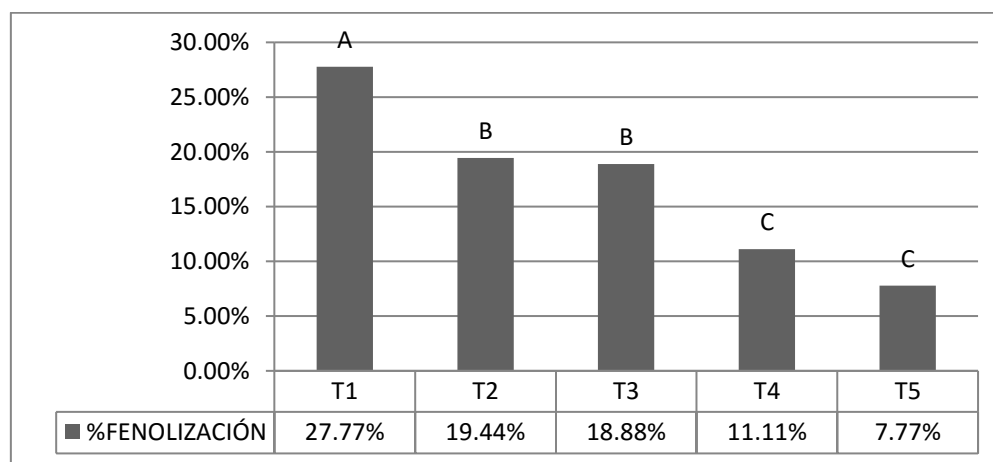


Figura 6: Respuesta en porcentaje de fenolización a los tratamientos de desinfección.

Los resultados de la interacción tipo de explante - tratamiento de desinfección que se observan en la Figura 7 muestran los mayores porcentajes de fenolización en los ápices caulinares sometidas a T1 (40 por ciento), seguido de yemas axilares sometidas a T3 (33.30 por ciento), yemas axilares y T1 (30 por ciento), mientras que los porcentajes más bajos fueron obtenidos por la yema apical y T3 (6.70 por ciento), ápices caulinares y T5 (3.30 por ciento), y apicales y T4 (0 por ciento).

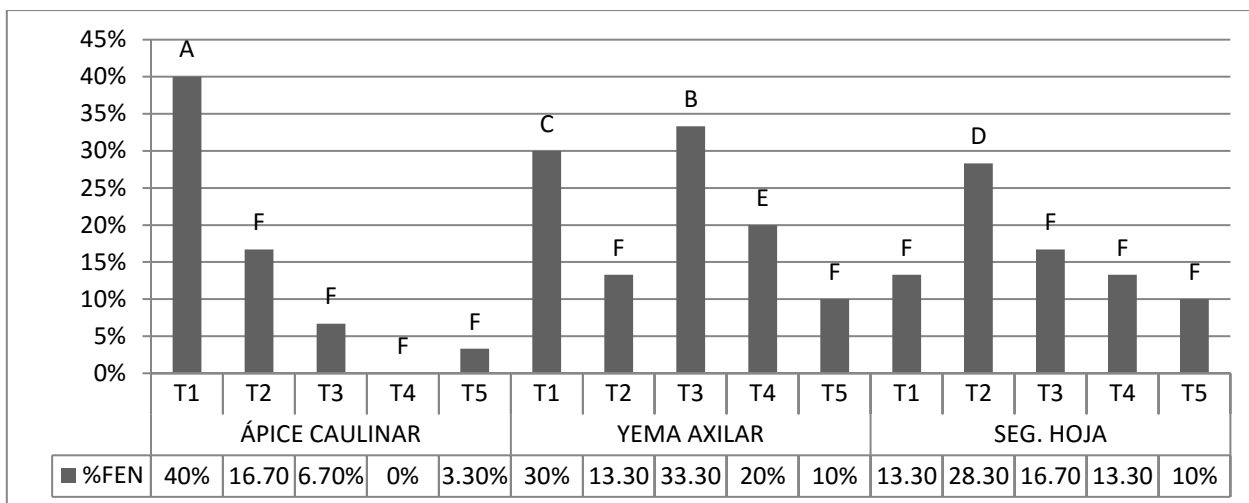


Figura 7: Respuesta en porcentaje de fenolización a la interacción entre los factores tipo de explante y tratamientos de desinfección.

- **Discusión:**

Según los resultados obtenidos, el T5 que empleó HgCl₂ logró el mayor porcentaje de brotes regenerados a partir de los explantes y los niveles más bajos de oxidación y fenolización. Este hecho es corroborado con la experiencia de Stoevska et. al. (1995) quienes obtuvieron mejores resultados (hasta un 90 por ciento de regeneración de brotes) con el uso de una solución de HgCl₂ al 0.1 por ciento, comparado con los otros 9 tratamientos que ellos emplearon como desinfectante al NaClO.

Las parejas de tratamientos T1 – T3 y T2 – T4 son muy similares, con la diferencia en que en los últimos (T3 y T4) fueron sumergidos en una solución de etanol al 70 por ciento previa a la inmersión en el agente desinfectante, ya que según Aguirre et. al. (2010), el alcohol tiene un efecto surfactante permitiendo una mayor penetración en el explante. Este procedimiento fue utilizado por Stoevska et. al. (1995), Gajdošovál et. al. (2005), Dai et. al. (2006), Wu et. al. (2009), Isac y Popescu (2009) y Jadán et. al. (2015). Sin embargo según Aguirre et. al. (2010), el uso del etanol a una alta concentración causa una deshidratación en los tejidos, y esto se manifestó cuando el porcentaje de explantes oxidados del T3 fue mayor al de T1, y el de T4 mayor al de T2.

4.1.4. PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN POR HONGOS

Según el análisis de varianza general del porcentaje de contaminación por hongos, se muestran diferencias significativas entre los factores especie, tipo de explante y tratamiento de desinfección, bajo un nivel de significancia de 0.05 (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis de varianza del porcentaje de contaminación por hongos en la etapa de desinfección

F. V.	G.L.	S.C.	C.M.	F-cal	P-VALOR	Significancia
Bloques	5	35.59	7.12	3.39	0.006	**
Especie	1	27.04	27.04	12.88	0.0005	***
Explante	2	60.98	30.49	14.53	0.0001	****
Desinfección	4	139.77	34.94	16.65	0.0001	****
Esp. X Exp.	2	9.35	4.68	2.23	0.11	NS
Exp. X Des.	8	11.73	1.47	0.70	0.69	NS
Esp. X Des.	4	20.04	5.01	2.39	0.05	NS
Exp. X Esp. X Des.	8	13.48	1.69	0.80	0.6	NS
ERROR	145	304.3	2.09862069			
TOTAL	179	622.28				

CV:24.80

($\alpha = 0.05$)

En la Figura 8 se observa el porcentaje de contaminación por hongos en respuesta a la especie, siendo la zarzamora la que presentó la mayor contaminación (32.44 por ciento) versus el 22.67 por ciento que se manifestó en la frambuesa.

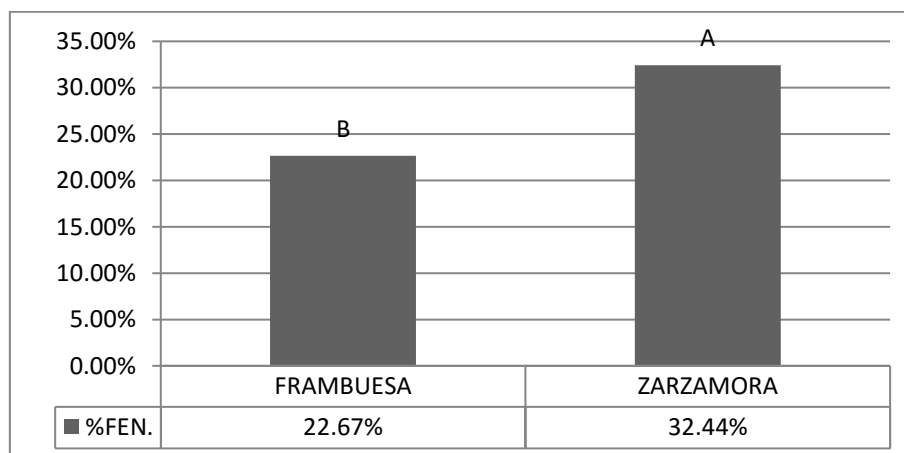


Figura 8: Respuesta en porcentaje de contaminación por hongos para las especies.

Se confirma estadísticamente para el factor tipo de explante (Figura 9) que las yemas axilares presentaron el mayor grado de contaminación (36 por ciento) seguido de los ápices caulinares (29 por ciento) y de los segmentos de hoja (17.66 por ciento).

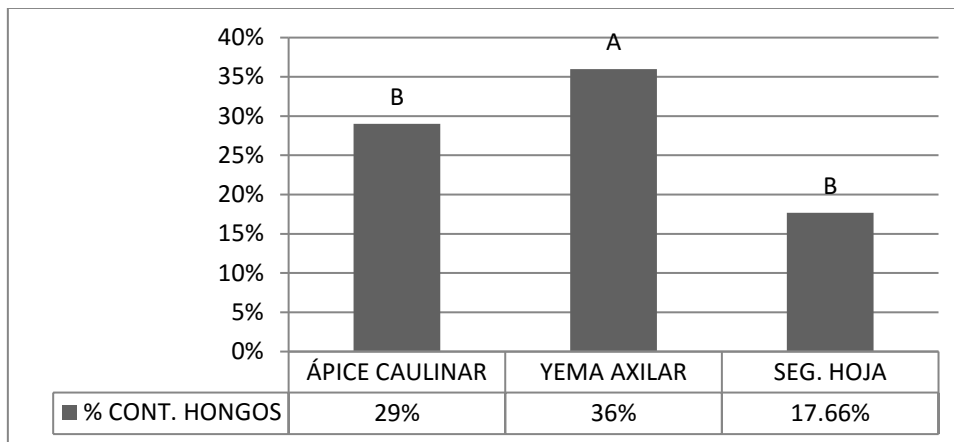


Figura 9: Respuesta en porcentaje de contaminación por hongos para los tipos de explante.

En la Figura 10 se observa que los mayores resultados frente a los tratamientos de desinfección fueron obtenidos por T2 y T4 (40% y 38.88% respectivamente), mientras que los tratamientos T1 y T3 produjeron ambos un 22.22%, y el T5 logró la menor contaminación con 14.44%.

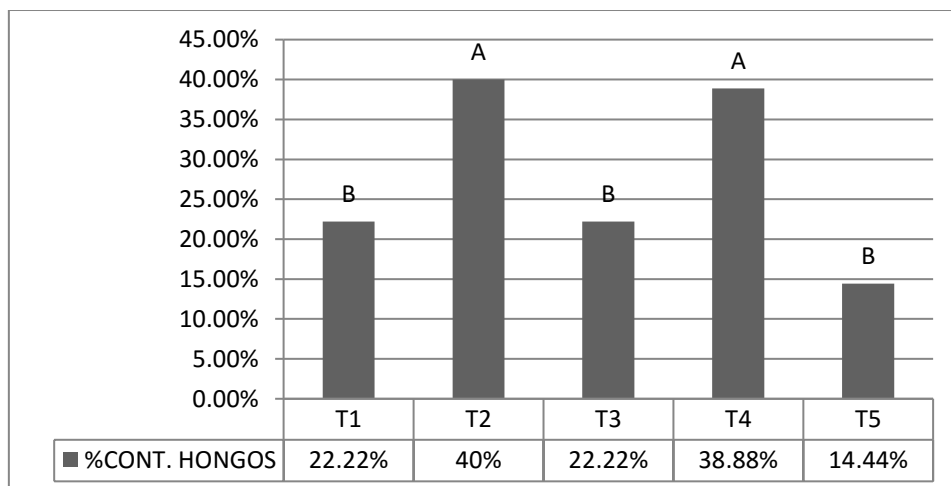


Figura 10: Respuesta en porcentaje de contaminación por hongos a los tratamientos de desinfección.

- Discusiones:

El tratamiento T5 logró el menor grado de contaminación comparándose con los otros cuatro tratamientos que emplean hipoclorito de sodio, tal como sucedió con Stoevska et. al. (1995). Como afirma Aguirre et. al. (2010), el cloruro de mercurio es empleado con muy poca frecuencia al ser altamente tóxico y de difícil remoción en el explante, sin embargo, como agente desinfectante ha garantizado los mejores resultados para esta etapa. Como se puede apreciar los tratamientos T3 y T4 logran mejores resultados que los tratamientos T1 y T2, debido a que a un mayor tiempo de inmersión en la solución desinfectante permite una mejor descontaminación. Este hecho es corroborado por la experiencia de Jadán et. al. (2015), además de que se corre el riesgo que los explantes sean menos viables tal como sucedió en este experimento.

4.1.5. PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN POR BACTERIAS

Según el análisis de varianza general del porcentaje de contaminación por bacterias, se muestran diferencias significativas en todas las fuentes de varianzas, a excepción de las interacciones las interacciones especie – tratamiento de desinfección y la interacción entre los tres factores, bajo un nivel de significancia de 0.05 (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de varianza del porcentaje de contaminación por bacterias en la etapa de desinfección

F. V.	G.L.	S.C.	C.M.	F-cal	p-VALOR	Significancia
Bloques	5	10.28	2.06	1.47	0.2	*
Especie	1	32.17	32.17	23.03	0.0001	****
Explante	2	160.07	80.04	57.30	0.0001	****
Desinfección	4	16.03	4.01	2.87	0.03	*
Esp. X Exp.	2	22.52	11.26	8.06	0.0005	***
Exp. X Des.	8	30.19	3.77	2.70	0.0084	**
Esp. X Des.	4	2.59	0.65	0.46	0.76	NS
Exp. X Esp. X Des.	8	14.22	1.78	1.27	0.26	NS
ERROR	145	202.52	1.39668966			
TOTAL	179	490.59				

CV:27.73

($\alpha = 0.05$)

Se confirma estadísticamente para las especies (Figura 11) que la zarzamora presentó un 15.55 por ciento de contaminación bacteriana, mientras que para la frambuesa se observa un 6.22 por ciento.

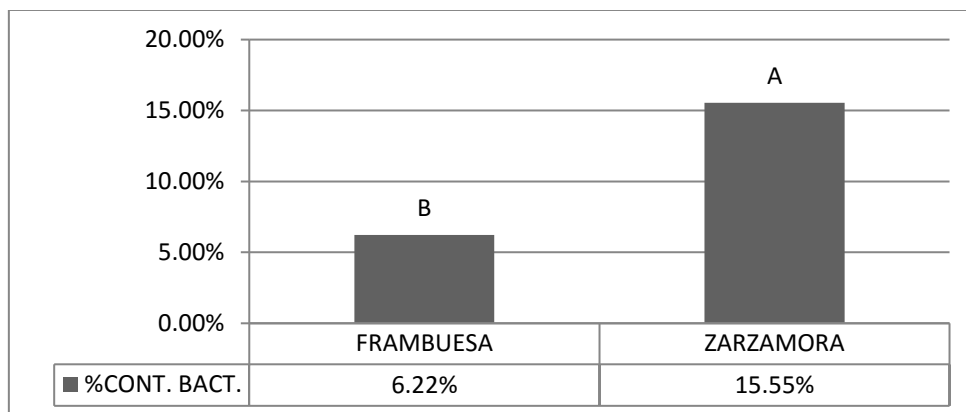


Figura 11: Respuesta en porcentaje de contaminación por bacterias para las especies.

En la Figura 12, los resultados obtenidos para el tipo de explante, muestran que las yemas axilares presentaron una mayor incidencia de bacterias (23 por ciento), seguido de los ápices caulinares (9.66 por ciento) mientras que no se presentaron bacterias en los segmentos de hojas.

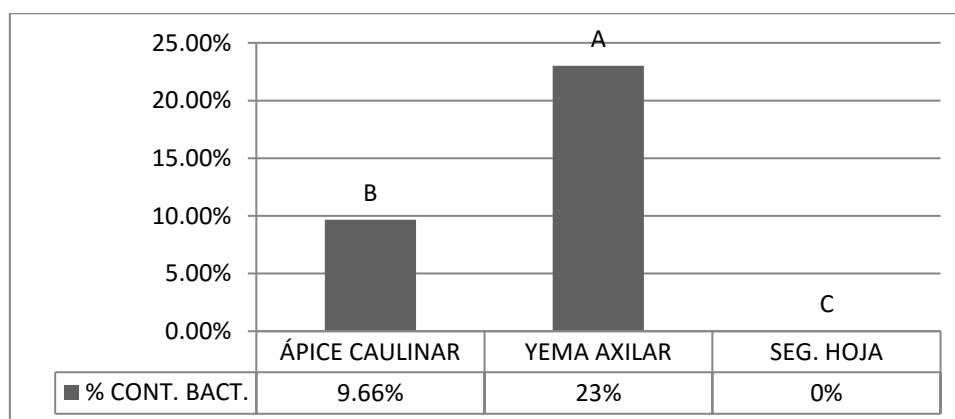


Figura 12: Respuesta en porcentaje de contaminación bacteriana para los diferentes tipos de explantes.

Los resultados obtenidos frente a los tratamientos de desinfección se observan en la Figura 13. El T3 presentó una mayor presencia bacteriana (17.22 por ciento), seguido de T2 (11.11 por ciento), T4 (9.44 por ciento), y la menor se mostró en T1 y T5 (8.33 por ciento).

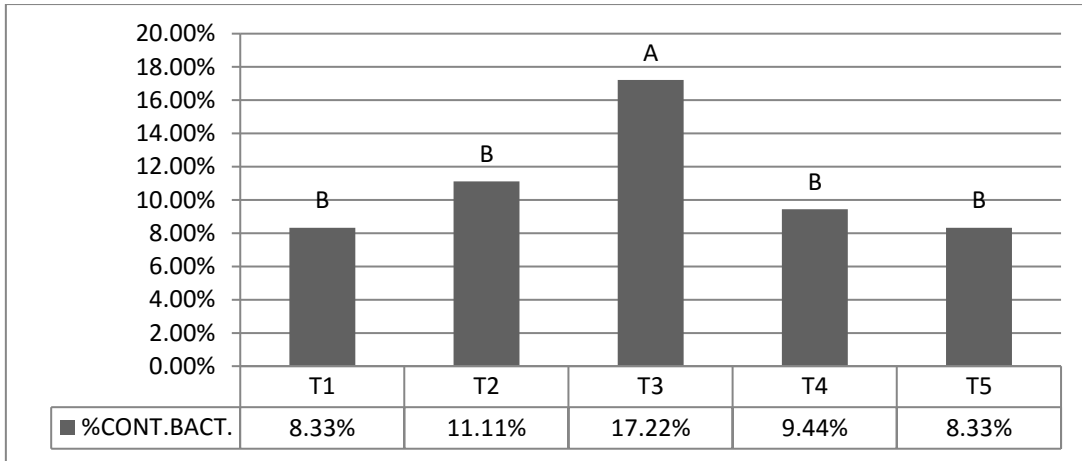


Figura 13: Respuesta en porcentaje de contaminación bacteriana para los tratamientos de desinfección.

En la Figura 14 se aprecian los resultados para la interacción entre especie y tipo de explante, la mayor contaminación bacteriana se presentó en las yemas axilares de frambuesa (32.70 por ciento), seguido por los ápices caulinares de frambuesa (14 por ciento), las yemas axilares (13.30 por ciento) y las apicales (5.30 por ciento) de zarzamora, mientras que los segmentos de hoja de zarzamora y frambuesa no presentaron signos de contaminación.

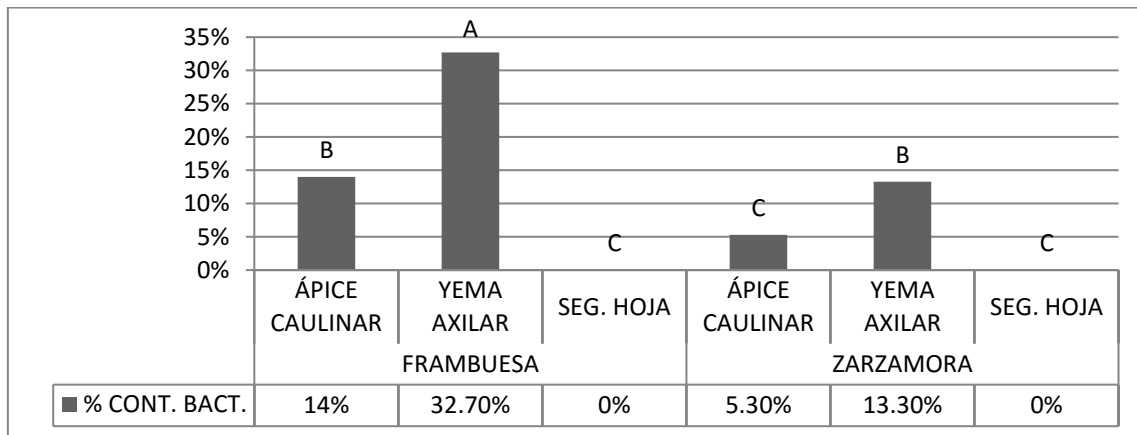


Figura 14: Respuesta en porcentaje de contaminación bacteriana para la interacción entre especie y tipos de explante.

Los resultados obtenidos para la interacción tipo de explante y tratamiento de desinfección se aprecian en la Figura 15, muestran que los niveles de infección bacteriana más altos se presentaron en yemas axilares, siendo el T2 (30 por ciento) el mayor, seguido del T3 (25 por

ciento), seguido por los tratamientos restantes (20 por ciento). Las ápices caulinares fueron los segundos en presentar bacterias, principalmente con el T3 (26.7 por ciento), seguido por T4 (8.3 por ciento), T1 y T5 (5 por ciento) y T2 (3.3 por ciento); mientras que los segmentos de hoja no presentaron contaminación alguna.

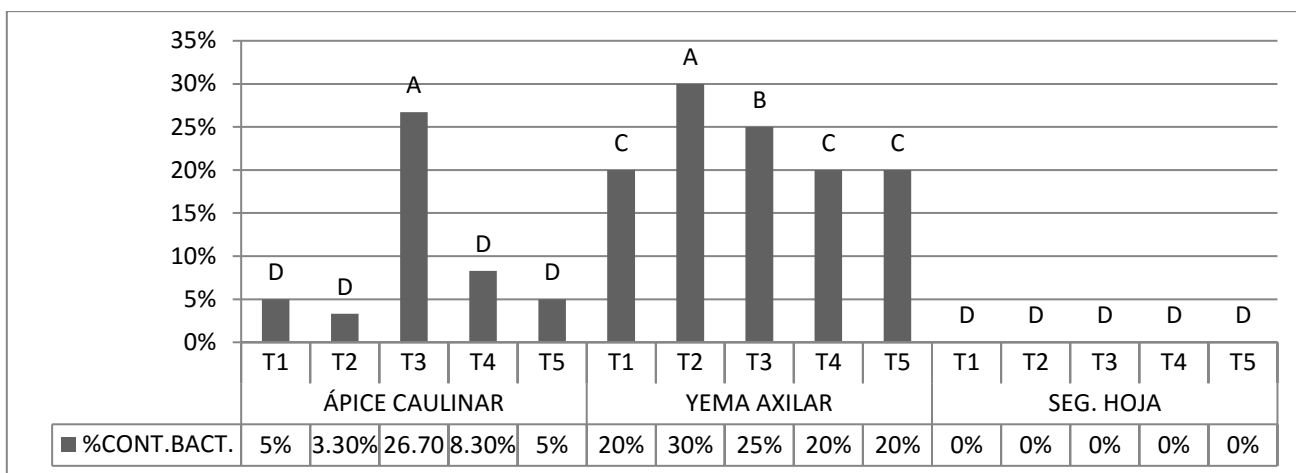


Figura 15: Respuesta en porcentaje de contaminación bacteriana para la interacción entre tipos de explante y tratamientos de desinfección.

- Discusiones:

Según lo que afirman Sigarroat-Rieche y García-Delgado (2011), los ápices meristemáticos son eficaces explantes primarios porque son fuente de material inocuo para la obtención de plántulas libres de contaminantes endógenos como bacterias y virus. Este antecedente se refuerza en este experimento, siendo las yemas axilares los explantes con mayor infección bacteriana puesto que están en contacto con los haces vasculares y estos llevan a los fluidos vegetales con alta carga bacteriana, mientras que en los ápices caulinares, al ser tejidos jóvenes y en pleno desarrollo no poseen tejidos conductores desarrollados que hayan traído a estos contaminantes, y eso se observa al realizar el corte para la siembra, en los nudos que contienen a las axilares se aprecia a la médula rodeada por el eje vascular secundario de

Pese a que hayan sido empleadas por Bobrowski et. al. (1996), Gajdošová1 et. al. (2005), Angelova y Arsov (2006), Minas y Neocleous (2007), Pesic-VanEsbroeck et. al. (2008), Wu et. al. (2009) y Jadán et. al. (2015), solo hay una yema en los tallos de los *Rubus* y por tanto es un material vegetativo escaso pero opcional que puede ser utilizado para la micro propagación.

4.2. ETAPA DE ESTABLECIMIENTO

4.2.1. PORCENTAJE DE REGENERACIÓN

Según al análisis de varianza general del porcentaje de regeneración se aprecia que los diferentes tipos de explante, los medios de desinfección, y la interacción entre ambos presentan diferencias significativas a un nivel de significancia de 0.05. (Tabla 9)

Tabla 9. Análisis de varianza del porcentaje de regeneración en la etapa de establecimiento

F. V.	G.L.	S.C.	C.M.	F-cal	p-VALOR	Significancia
Bloque	5	1557.78	311.56	1.48	0.19	NS
Especie	1	2.22	2.22	0.01	0.91	NS
Explante	2	115791.11	57895.56	275.16	0.0001	****
Establecimiento	4	5413.33	1353.33	6.43	0.0001	****
Esp. X Exp.	2	4.44	2.22	0.01	0.98	NS
Exp. X Est.	8	5320.00	665.00	3.16	0.0025	**
Esp. X Est.	4	53.33	13.33	0.06	0.99	NS
Esp. X Exp. X Est.	8	40.00	5.00	0.02	1	NS
Error	145	30508.89	210.406138			
TOTAL	179	158691.11				CV:20

($\alpha = 0.05$)

Los resultados para el porcentaje de regeneración en esta etapa (Figura 16) se muestran los más altos en yemas axilares (60.67 por ciento), seguida de la ápice caulinar (43.33 por ciento), sin embargo los segmentos de hoja no respondieron a la aplicación de hormonas.

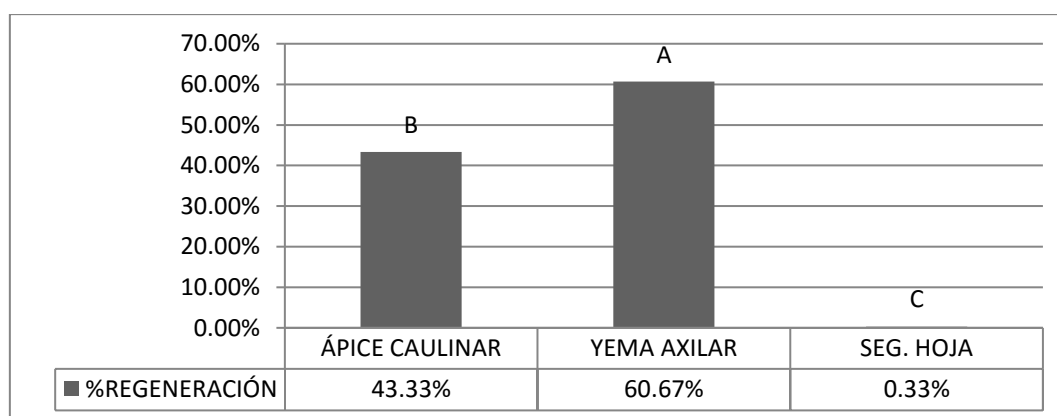


Figura 16: Respuesta en porcentaje de regeneración para los tipos de explantes.

En la Figura 17 se muestran que M1 obtuvo el mayor porcentaje de regeneración (41.11 por ciento), junto con el medio M3 (36.67 por ciento) habiendo logrado un resultado superior al tratamiento control M5 (37.78 por ciento), mientras que los tratamientos M2 (33.33 por ciento) y M4 (25 por ciento) no se observó la misma tendencia.

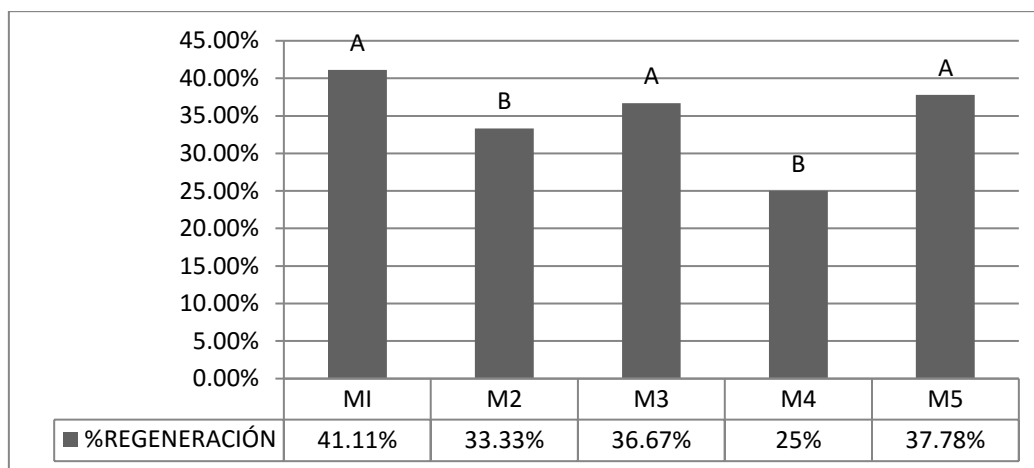


Figura 17: Respuesta en porcentaje de regeneración para los medios de establecimiento.

En la Figura 18, los resultados para la interacción tipo de explante – medio de establecimiento fueron agrupados en 5 grupos de significancia, ordenados de mayor a menor porcentaje de regeneración y se detallan en el siguiente cuadro N°10:

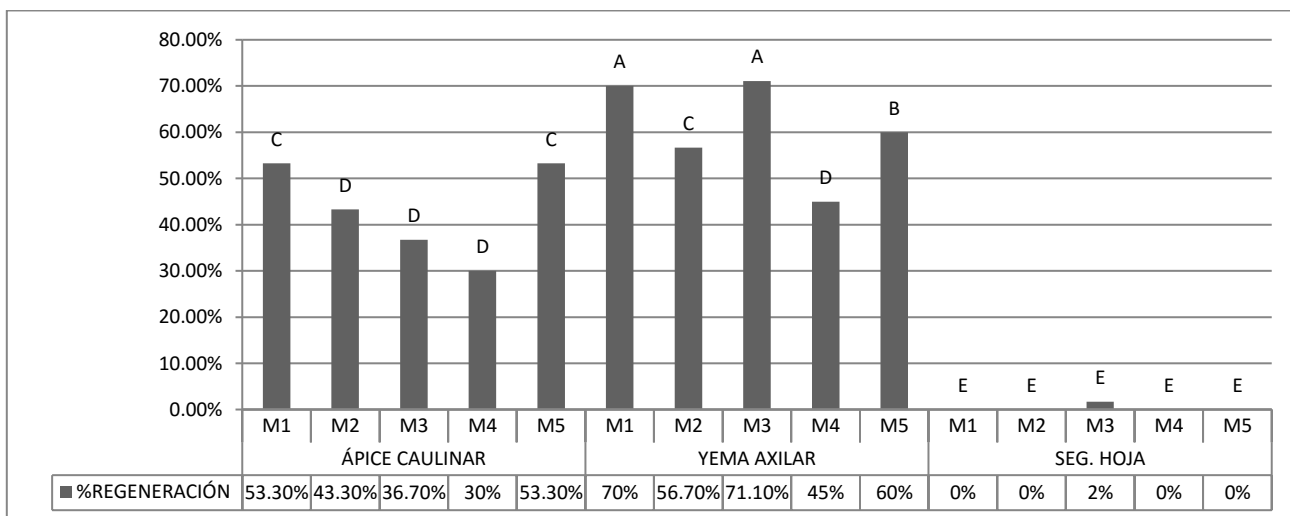


Figura 18: Respuesta en porcentaje de regeneración para la interacción entre tipo de explante y medios de establecimiento

Tabla 10. Grupos de significancia para la interacción: tipo de explante y medio de establecimiento

Grupo de significancia	Interacción	% Regeneración
A	Axilar - M3	71.11
	Axilar - M1	70
B	Axilar - M5	60
C	Axilar - M2	56.7
	Ápice - M5	53.3
	Ápice - M1	53.3
D	Axilar - M4	45
	Ápice - M2	43.3
	Ápice - M3	36.7
	Ápice - M4	30
E	Hoja - M3	2
	Hoja - M1	0
	Hoja - M2	0
	Hoja - M4	0
	Hoja - M5	0

4.2.2. PORCENTAJE DE OXIDACIÓN

Según al análisis de varianza general, se aprecia que las fuentes de variación especie, tipo de explante, medio de establecimiento y la interacción especie - tipo de explante, presentan diferencias significativas a un nivel de significancia de 0.05. (Tabla 11)

Tabla 11. Análisis de varianza del porcentaje de oxidación en la etapa de establecimiento

F. V.	G.L.	S.C.	C.M.	F-cal	p-VALOR	Significancia
Bloque	5	5806.67	1161.33	4.01	0.0019	**
Especie	1	1620.00	1620.00	5.59	0.02	*
Explante	2	76893.33	38446.67	132.75	0.0001	****
Establecimiento	4	7933.33	1983.33	6.85	0.0001	****
Esp. X Exp.	2	2280.00	1140.00	3.94	0.02	*
Exp. X Est.	8	4040.00	505.00	1.74	0.09	NS
Esp. X Est.	4	324.44	81.11	0.28	0.89	NS
Esp. X Exp. X Est.	8	608.89	76.11	0.26	0.97	NS
Error	145	41993.33	289.609172			
TOTAL	179	141499.99				

CV:27.59

($\alpha = 0.05$)

En los resultados que se observan en la Figura 19, la frambuesa presenta un 64.08 por ciento de oxidación, contra un ligeramente menor 58.67 por ciento en la zarzamora.

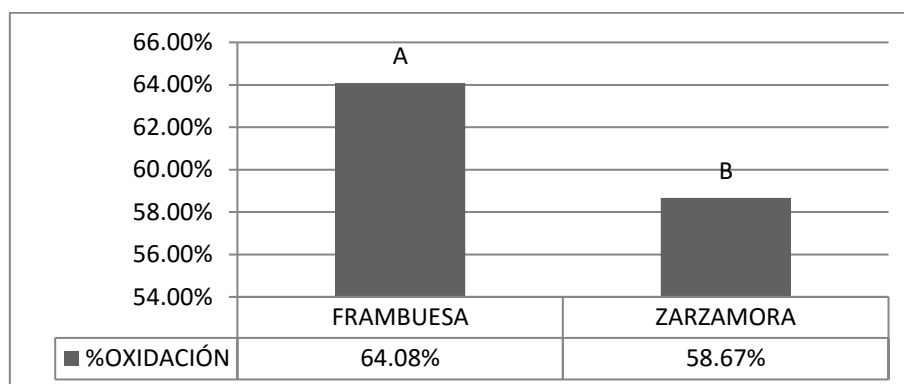


Figura 19: Respuesta en porcentaje de oxidación para ambas especies

En la Figura 20 se observa el mayor porcentaje de oxidación en los segmentos de hoja (89.33 por ciento), mientras que los ápices caulinares presentaron un 56 por ciento y en las yemas axilares se observó un 39.67 por ciento, siendo el explante con mayor índice de supervivencia al efecto hormonal de los medios de cultivo.

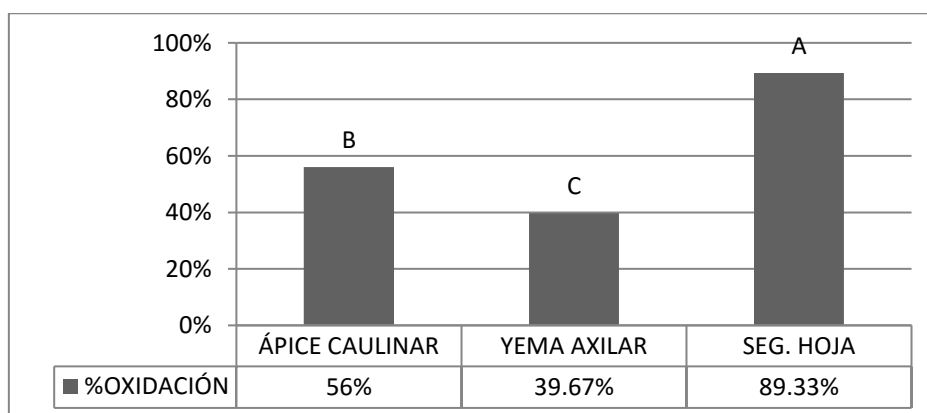


Figura 20: Respuesta en porcentaje de oxidación para ambas especies

En la Figura 21 se observa que el M4 produjo el mayor porcentaje de oxidación (70.56 por ciento), seguido por el tratamiento M3 (68.33 por ciento), y luego por los tratamientos M2 (58.89 por ciento), M5 (57.22 por ciento) y M1 (53.33 por ciento) que tuvieron porcentajes bastante similares.

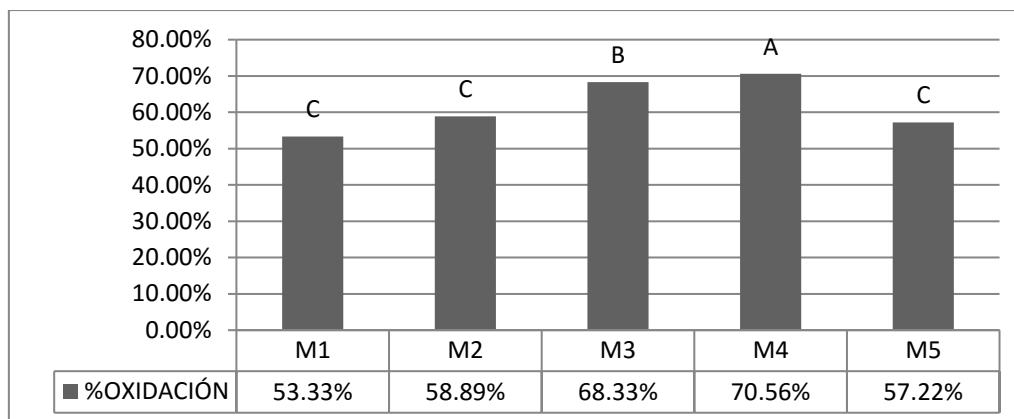


Figura 21: Respuesta en porcentaje de oxidación para los medios de establecimiento.

En la Figura 22 se aprecian 4 grupos con significancias diferentes para los resultados a la interacción especie – tipo de explante: A y B formado por los segmentos de hoja de frambuesa (97.3 por ciento) y los de zarzamora (81.3 por ciento) respectivamente; el grupo C formado por los ápices caulinares de frambuesa y de zarzamora ambas con 56 por ciento y el grupo D, formado por las yemas axilares de frambuesa 40.70 por ciento y por las de zarzamora con 38.70 por ciento.

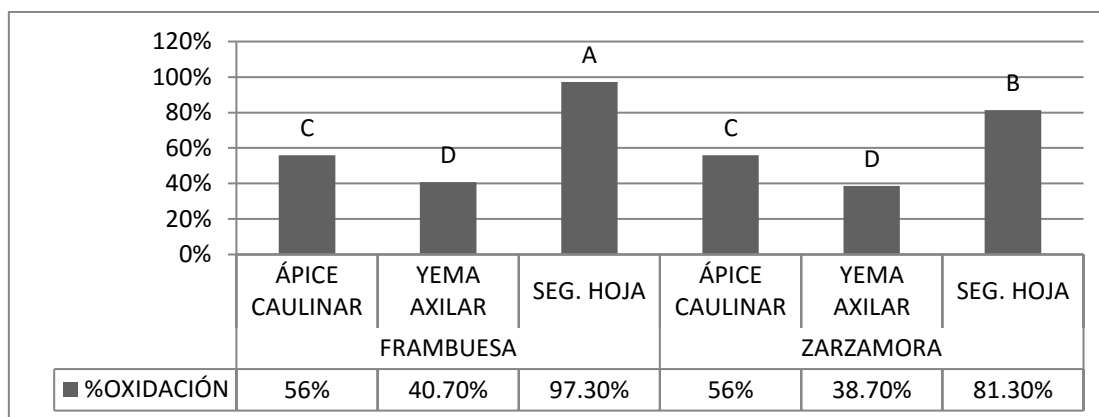


Figura 22: Respuesta en porcentaje de oxidación para la interacción especie y tipo de explante.

- Discusiones:

Según Aguirre et. al. (2010) el empleo de citoquininas es necesario, siendo el BAP en concentraciones de 0.05 a 1 mg/L da buenos resultados para el cultivo de muchas especies entre

ellas *Rubus*. Tanto como en la Regeneración y la Oxidación, consecuencias contrarias en el cultivo de tejidos, el medio suplementado con 1mg/L de BAP fue el mejor tratamiento para el establecimiento en el cultivo in vitro de las dos especies de *Rubus*. Esta tendencia se aprecia en la mayoría de las experiencias previas en la micro propagación de la frambuesa y la zarzamora, como las de Gajdošová1 et. al. (2005), Ostrolucká et. al. (2005), Lazić y Ružić (2007), Clapa et. al. (2008), Sigarroa-Reiche y García-Delgado (2011) obteniendo regeneraciones que van desde el 44.8 hasta un 66 por ciento.

Reed (1990), Cousineau y Donnelly (1991), Stoevska et. al. (1995) y Robres-Torres et. al. (2015) emplearon benciladenina (BA), una citoquinina con propiedades y composición similares a la BAP, pero con la misma dosis que la del tratamiento más favorable (M1). Stoevska et. al. emplearon otros tratamientos con dosis mayores de BA, pero la de 1 mg/L fue la más eficaz.

La regeneración fue menor en los medios que emplearon 2 mg/L de BAP (M2) y TDZ (M3 y M4) comparados con el medio libre de hormonas del M5, Bobrowski et. al. (1996) empleó medios suplementados con 1 y 2 mg/L de BAP con resultados superiores al MLH, a diferencia de este experimento que solamente la primera dosis es mejor al medio control. Jafari y Hamidoghli (2009), Vujović et. al. (2010), y Dziadczyk et. al. (2013) emplearon la misma dosis del medio M2 para el desarrollo de sus explantes donadores de segmentos foliares con éxito. Los tratamientos con TDZ que se emplearon en la tesis se basaron en la experiencia de Jadán et. al. (2015), con la diferencia que en esta experiencia estos tratamientos no fueron exitosos. Según lo que se puede apreciar, una dosis hormonal menor causa un menor estrés y por lo tanto una mayor regeneración y una menor oxidación. Es muy probable que empleando una dosis menor, similar a las empleadas por Zawadzka y Orlikowska (2006) (0.8 mg/L de BAP), Amalia et. al. (2014) (0.6 mg/L de BA) y Cheong et. al. (2014) (0.25 mg/L de BAP). Isac y Popescu (2009) que emplearon 0.1 mg/L de BA pudieron alcanzar hasta un 75 por ciento de regeneración de brotes. De la misma forma ocurre con el TDZ, sucedió en la experiencia de Jadán et. al. (2015) que logró un 100% de regeneración con una dosis de 0.5 mg/L.

4.2.3. LONGITUD DE BROTES POR EXPLANTE

Según al análisis de varianza general de la longitud de brotes se aprecia que todas las fuentes de variación presentan diferencias significativas a un nivel de significancia de 0.05. (Tabla 12)

Tabla 12. Análisis de varianza de la longitud de brotes por explante en la etapa de establecimiento

F. V.	G.L.	S.C.	C.M.	F-cal	p-VALOR	Significancia
Bloque	5	9.22	1.84	2.21	0.06	NS
Especie	1	153.24	153.24	184.05	0.0001	****
Explante	2	6924.81	3462.41	4158.44	0.0001	****
Establecimiento	4	169.12	42.28	50.78	0.0001	****
Esp. X Esp.	2	96.23	48.12	57.79	0.0001	****
Exp. X Est.	8	233.94	29.24	35.12	0.0001	****
Esp. X Est.	4	64.27	16.07	19.30	0.0001	****
Esp. X Esp. X Est.	8	110.72	13.84	16.62	0.0001	****
Error	145	120.73	0.83262069			
TOTAL	179	7882.28				CV:10.47

($\alpha = 0.05$)

En la Figura 23 se muestra que la longitud de los brotes de frambuesa fue de 9.63 milímetros, mientras que los brotes de zarzamora alcanzaron 7.78 milímetros.

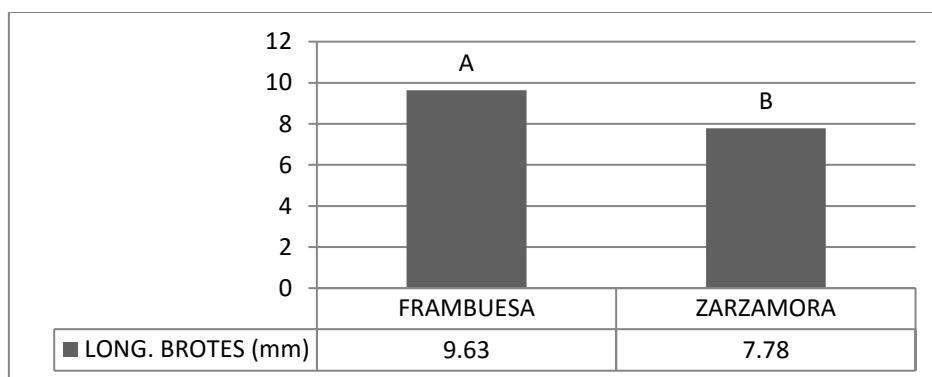


Figura 23: Respuesta en longitud de brotes para el factor especie

La respuesta para el tipo de explante en longitud de brotes se muestra en la Figura 24, siendo las yemas axilares las que logran el mayor valor (13.96 milímetros), seguidas por los brotes provenientes del ápice caulinar (12.16 milímetros), mientras que los segmentos de hoja no presentan reacción alguna.

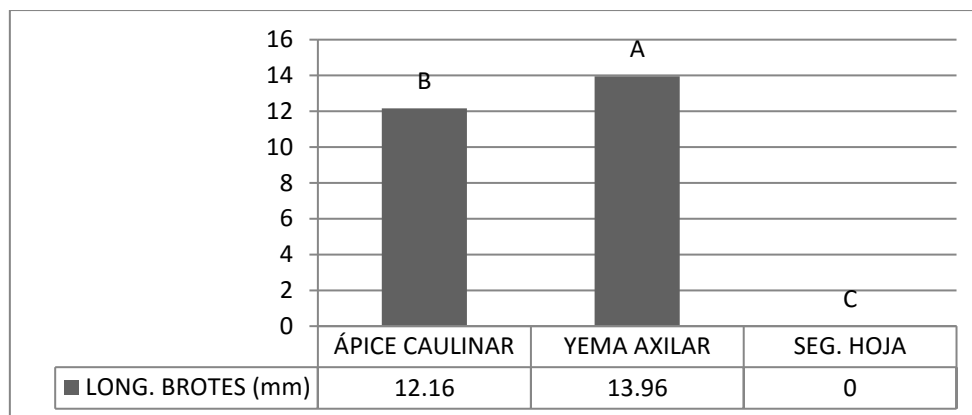


Figura 24: Respuesta en longitud de brotes para el factor tipo de explante

Los resultados para los medios de establecimiento (Figura 25) muestran que los brotes de mayor longitud fueron alcanzados por los medios M1 (9.83 milímetros) y M2 (9.81 milímetros), seguidos por el tratamiento control M5 (8.57 milímetros), mientras que los de menor tamaño se lograron con los medios M3 (7.69 milímetros) y M4 (7.62 milímetros).

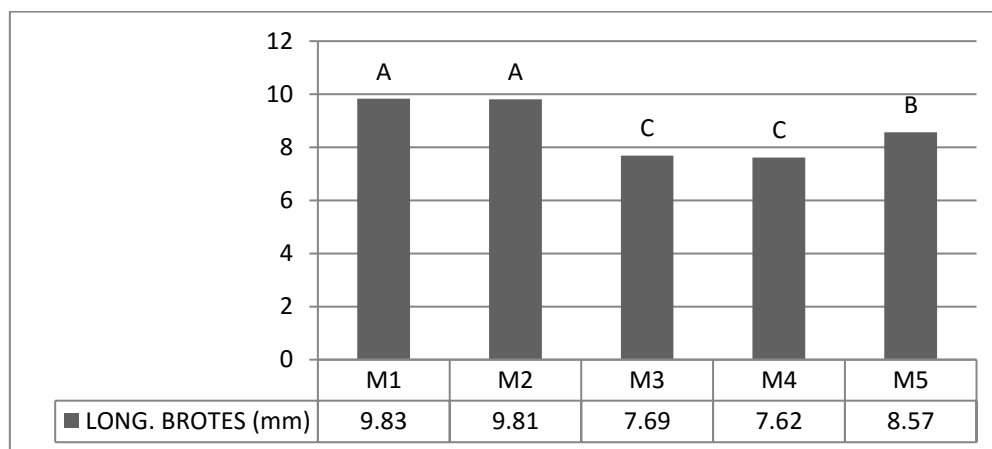


Figura 25: Respuesta en longitud de brotes frente a los medios de establecimiento

En la Figura 26 se aprecian cuatro grupos con valores de significancia similares para los resultados de longitud de brotes para la interacción entre especie y tipo de explante: A, formado por las yemas axilares (14.9 mm) y ápices (14 mm) de frambuesa; B, formado por las yemas axilares de zarzamora (13 mm); C, formado por los ápices caulinares de zarzamora (10.4 mm) y el grupo D formado por los segmentos de hoja, cuya regeneración de brotes es nula por tanto no es posible medir su longitud.

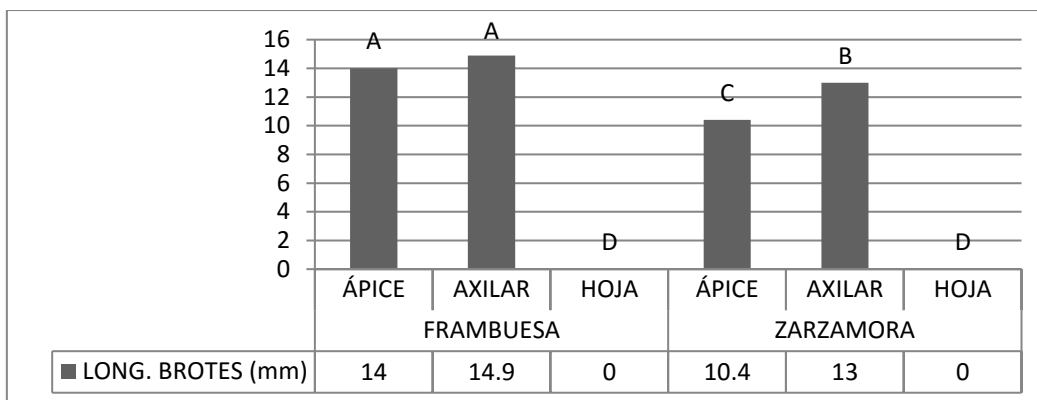


Figura 26: Respuesta en longitud de brotes para la interacción entre especie y tipos de explante.

Los resultados para la interacción entre especie y medios de establecimiento arrojaron cuatro grupos de significancias similares que se aprecian en la Figura 27: el grupo A, formado por los brotes de frambuesa desarrollados sobre el M1 (11.5 mm) y sobre M2 (11.2 mm); el grupo B formado por la frambuesa sembrada sobre el M5 (9.5 mm); el grupo C formado por la zarzamora sembrada en el M2 (8.45 mm). Los brotes con menor tamaño fueron agrupados en D, formado por los explantes de zarzamora sembrados sobre el M1 (8.1 mm), seguidos por los de frambuesa sembrados en el M3 (8 mm) y el M4 (7.8 mm), y los explantes de zarzamora desarrollados sobre los medios M5 (7.6 mm), M3 y M4 (7.4 mm).

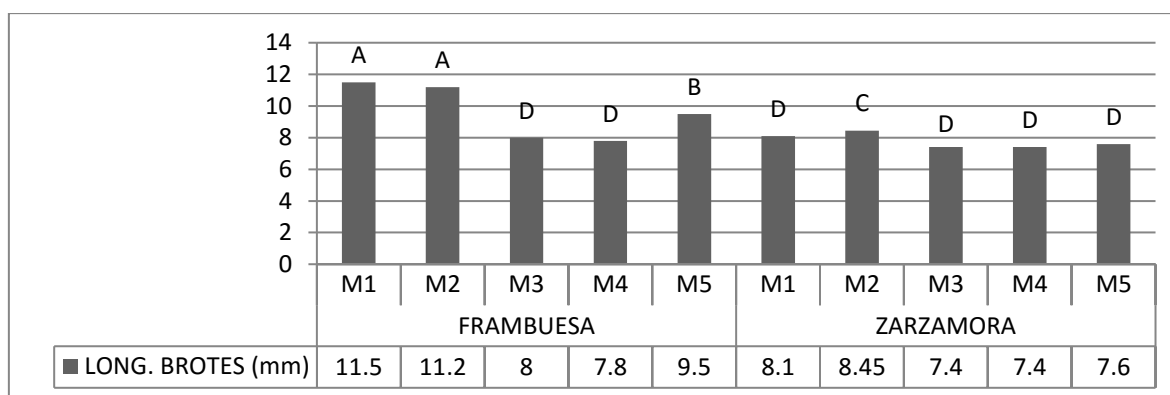


Figura 27: Respuesta en longitud de brotes para la interacción entre especie y medios de establecimiento

Los resultados de longitud de brotes por explantes, para la interacción entre tipo de explante y medio de establecimiento (Figura 28) se clasificaron en seis grupos con significancias muy parecidas, como se detalla a continuación:

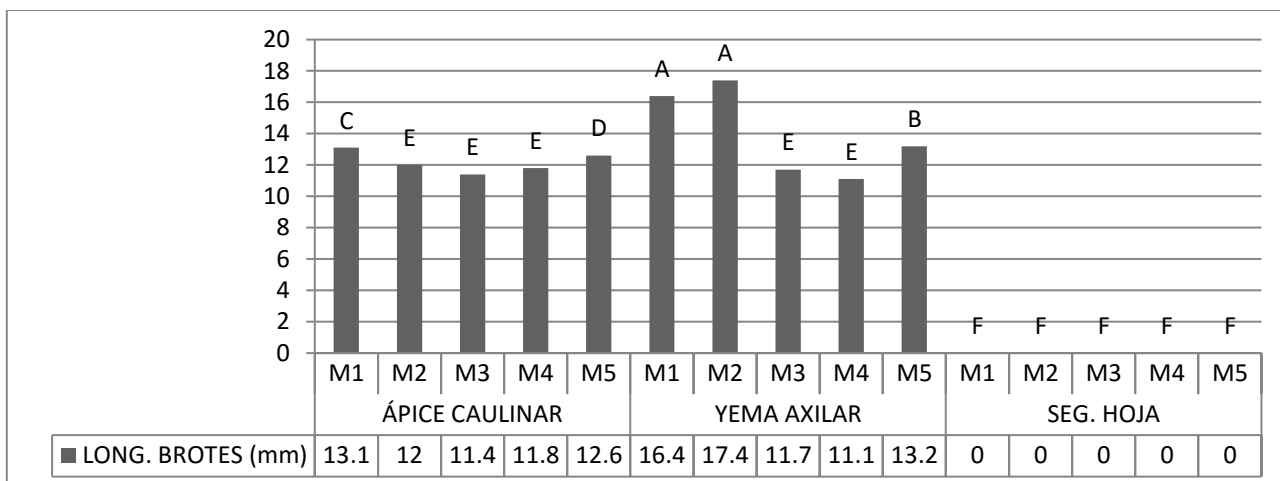


Figura 28: Respuesta en longitud de brotes para la interacción entre tipo de explante y medios de establecimiento

Tabla 13. Grupos de significancia para la interacción entre tipo de explante y medio de establecimiento, para la variable longitud de brotes por explante

SIGNIFICANCIA	TIPO DE EXPLANTE X MEDIO DE ESTABLECIMIENTO	LONG. BROTES (mm)
A	Axilar -T2	17.4
	Axilar -T1	16.4
B	Axilar -T5	13.2
C	Ápice - T1	13.1
D	Ápice -T5	12.6
E	Ápice -T2	12
	Ápice -T4	11.8
	Axilar -T3	11.7
	Ápice -T3	11.4
	Axilar -T4	11.1
F	Hoja -T1	0
	Hoja -T2	0
	Hoja -T3	0
	Hoja -T4	0
	Hoja -T5	0

- **Discusión:**

Se puede observar que en general, los brotes de frambuesa obtenidos son más largos que los de zarzamora. Esta experiencias no concuerdan con lo manifestado con Graham (1997) que menciona que la segunda tiene un mayor potencial regenerativo que la primera, posiblemente las variedades que empleó no sean las mismas que las usadas en este proyecto. Según los resultados, las yemas axilares son los explantes que logran los brotes con mayor vigor, consecuentemente se puede apreciar que las dosis hormonales de BAP fueron más efectivas que las de TDZ en cuanto a tamaño de brotes, incluso esta segunda hormona no supera a los brotes obtenidos sobre el tratamiento control, dando a entender que el TDZ no causa una inducción adecuada al menos para los genotipos de *Rubus* empleados para esta tesis.

4.2.4. NÚMERO DE BROTES POR EXPLANTE

De acuerdo al análisis de varianza para el número de brotes por explante, se observa que solo hay diferencias significativas en todas las fuentes de variación, a un nivel de significancia de 0.05 (Tabla 14)

Tabla 14. Análisis de varianza del número de brotes por explante en la etapa de establecimiento

F. V.	G.L.	S.C.	C.M.	F-cal	p-VALOR	Significancia
Bloque	5	0.04	0.01	1.14	0.06	NS
Especie	1	0.21	0.21	29.85	0.0001	****
Explante	2	15.77	7.89	1120.91	0.0001	****
Establecimiento	4	2.48	0.62	88.14	0.0001	****
Esp. X Esp.	2	1.26	0.63	89.56	0.0001	****
Exp. X Est.	8	2.23	0.28	39.63	0.0001	****
Esp. X Est.	4	0.07	0.02	2.49	0.0001	****
Esp. X Esp. X Est.	8	0.75	0.09	13.33	0.0001	****
Error	145	1.02	0.00703448			
TOTAL	179	23.83				CV:5.94

($\alpha = 0.05$)

Se confirma estadísticamente (Figura 29) que el número de brotes fue mayor para la frambuesa (1.44) que para la zarzamora (1.37).

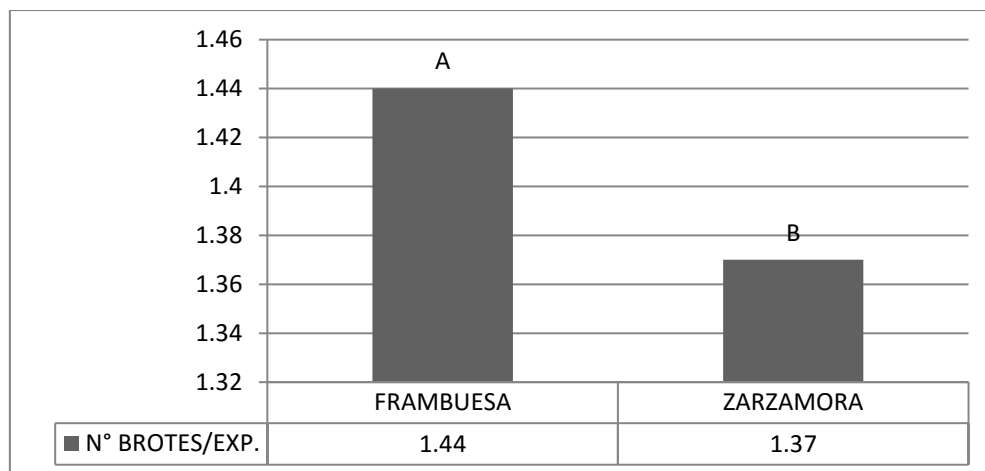


Figura 29: Respuesta en número de brotes por explante para las especies de *Rubus*

En la Figura 30 se confirma estadísticamente que el mayor número de brotes se obtiene a partir de yemas axilares (1.88), seguido de los ápices caulinares (1.5), mientras que los segmentos de hoja no presentaron regeneración de brotes.

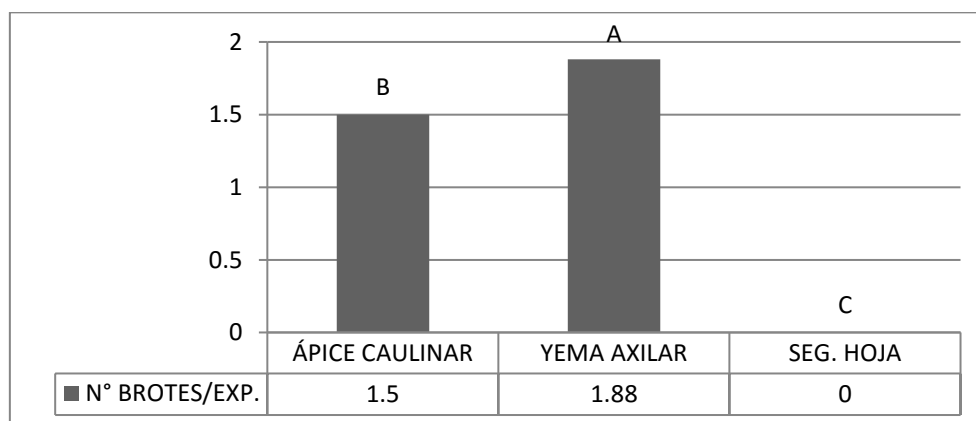


Figura 30: Respuesta en número de brotes por explante para los diferentes tipos de explante

Se confirma estadísticamente (Figura 31) que el mayor número de brotes se logró con los medios que están suplementados con TDZ: M4 (1.78) y M3 (1.45), siendo superior al obtenido con el medio sin hormonas M5 (0.82). El medio M1 (1 mg/L de BAP) obtuvo un número de brotes ligeramente mayor al de M5, pero el M2 aunque tenga el doble de dosis hormonal tiene un efecto contrario.

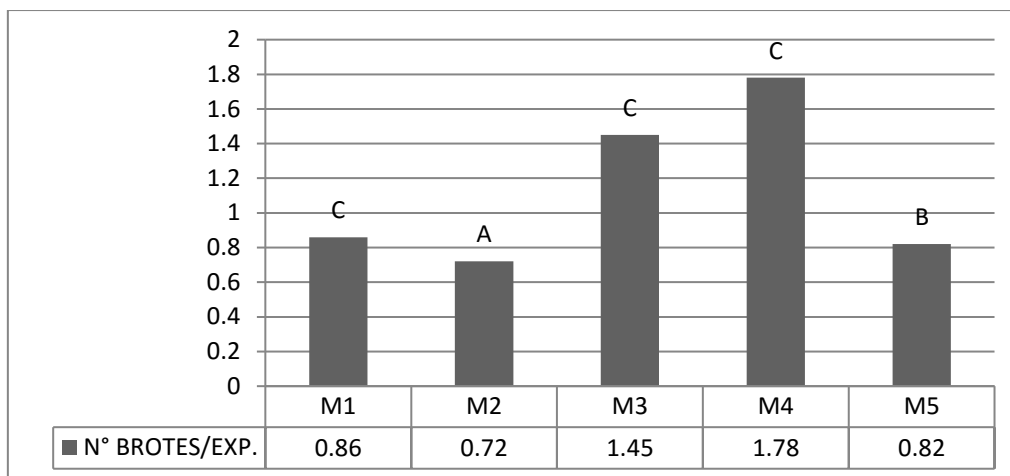


Figura 31: Respuesta en número de brotes por explante para los medios de establecimiento

Para la interacción entre el factor especie y tipo de explante, los resultados muestran en la Figura 32, que el mayor número de brotes por explante se da en las yemas axilares de zarzamora (2.5), seguidas de los ápices (2) y las yemas axilares de frambuesa (1.7), mientras que los ápices caulinares de zarzamora lograron un solo brote por explante y los segmentos de hoja no presentan respuesta alguna.

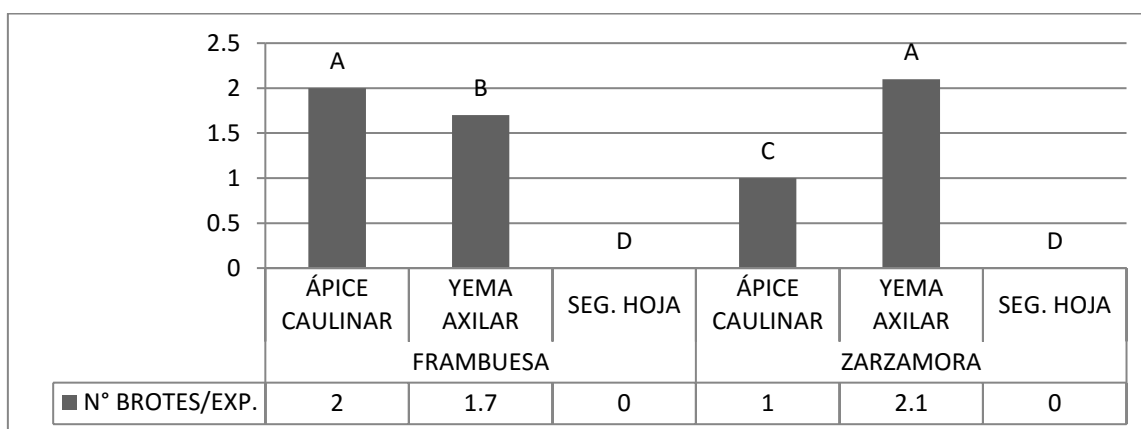


Figura 32: Respuesta en número de brotes por explante para la interacción especie y tipos de explante.

En la Figura 33, se observan los resultados para la interacción entre especie y medio de establecimiento, los que fueron clasificados en tres grupos con significancias similares entre ellos, como se puede apreciar en el siguiente cuadro:

Tabla 15. Grupos de significancia para la interacción entre especie y medio de establecimiento, para la variable número de brotes por explante

SIGNIFICANCIA	INTERACCIÓN ESPECIE x MEDIO DE ESTABLECIMIENTO	N° BROTES
A	Frambuesa - M4	1.9
	Frambuesa - M3	1.7
	Zarzamora - M4	1.6
B	Zarzamora - M3	1.3
C	Frambuesa - M1	1
	Frambuesa - M2	0.9
	Zarzamora - M2	0.8
	Zarzamora - M1	0.7
	Frambuesa - M5	0.7
	Zarzamora - M5	0.7

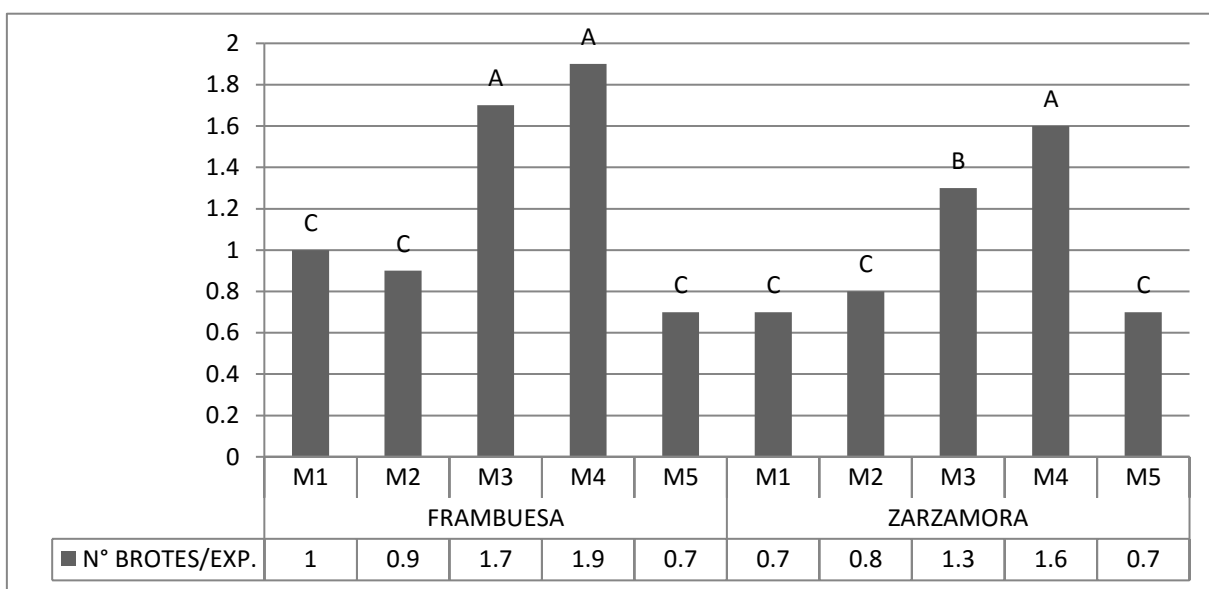


Figura 33: Respuesta en número de brotes por explante para la interacción especie y medio de establecimiento.

Los resultados para la interacción entre el tipo de explante y el medio de establecimiento se aprecian en la Figura 34, también se observa en la Tabla 16 que se agrupan en cinco grupos con significancias diferentes:

Tabla 16. Grupos de significancia para la interacción entre tipo de explante y medio de establecimiento, para la variable número de brotes por explante.

SIGNIFICANCIA	INTERACCIÓN TIPO DE EXPLANTE x MEDIO DE ESTABLECIMIENTO	Nº BROTES/EXPLANTE
A	Axilar - M4	3.5
B	Axilar - M3	2.4
C	Ápice - M3	2
C	Ápice - M4	1.9
D	Ápice - M1	1.4
D	Axilar - M2	1.3
D	Ápice - M2	1.3
D	Axilar - M5	1.1
D	Axilar - M1	1.1
D	Ápice - M5	1
E	Hoja - M1	0
E	Hoja - M2	0
E	Hoja - M3	0
E	Hoja - M4	0
E	Hoja - M5	0

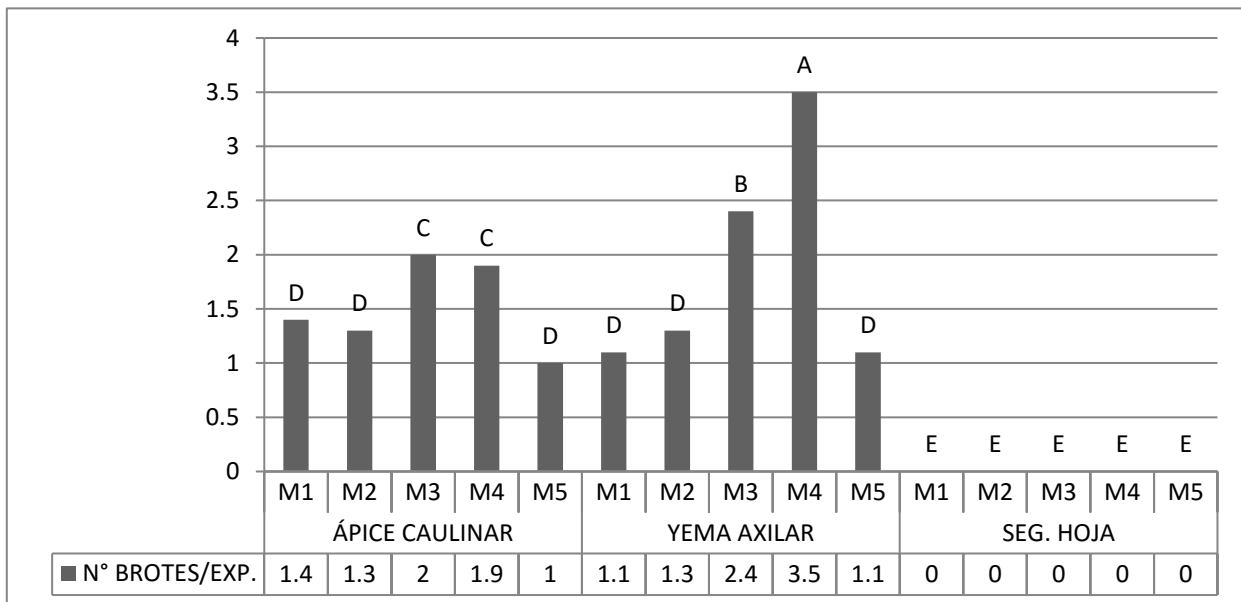


Figura 34: Respuesta en número de brotes por explante para la interacción tipo de explante y medios de establecimiento.

- Discusiones:

El mayor número de brotes por explante se forma en la frambuesa, mientras que las yemas axilares forman más brotes que el ápice caulinar. Aunque los tratamientos con TDZ logran un mayor número de brotes que aquellos con BAP, el tamaño que se logra es bastante menor.

En el experimento de Cousineau y Donnelly (1991) el número de brotes alcanzado con el TDZ fue mucho mayor (3.7 brotes/explante) que con el de BA (1 mg/L). Se observa que en aquel ensayo, el número alcanzado fue superior, esto debido a la presencia de 1 mg/L de AIB y según Aguirre et. al. (2010) el desarrollo de callos y la multiplicación de brotes se da al establecer un balance adecuado en la relación hormonal entre auxinas y citoquininas.

Los segmentos de hoja no fueron reactivos en los genotipos empleados, aunque al igual que las experiencias de Turk et. al. (1994) se emplearon las hojas más superiores de los brotes más jóvenes sin obtener resultados. Es muy posible que el material genético de las variedades empleadas por ellos hayan tenido características genéticas superiores, o que la adición de la auxina AIB es necesaria en conjunción con el TDZ para lograr la regeneración adventicia.

En las experiencias de Meng et. al. (2004) se obtuvo hasta 42 brotes por explante al emplear 1 mg/L de BA adicionado con AIB a 0.1 mg/L, Mészáros et. al. (2005) empleó también BA combinado con una auxina, el ácido indolacético, obteniendo buenos resultados. Zawadzka y Orlikowska (2006) también lograron empleando TDZ en combinación con AIB (0.1 mg/L).

En otras experiencias como la de Ostrolucká et. al. (2005) el TDZ logró regeneración adventicia combinado con 2,4 -D. Además Lazić y. Ružić (2007) manifiestan que la aplicación de AG3 mejora la reacción de regeneración adventicia incluso empleando la hormona TDZ sobre el BAP.

4.3. ETAPA DE ENRAIZAMIENTO

4.3.1. PORCENTAJE DE ENRAIZAMIENTO

Según al análisis de varianza general del porcentaje de enraizamiento se aprecian presentan diferencias significativas entre especie, medio de cultivo y dosis hormonal de AIB, a un nivel de significancia de 0.05 (Tabla 17).

Tabla 17. Análisis de varianza del porcentaje de enraizamiento en la etapa de enraizamiento

F. V.	G.L.	S.C.	C.M.	F-cal	p-VALOR	Significancia
Bloque	5	3111.11	622.222	6.31	0.0001	****
Especie	1	8022.222	8022.222	81.37	0.0001	****
Medio de Cultivo	1	4355.555	4355.555	44.18	0.0001	****
AIB	2	4811.111	2405.5555	24.40	0.0001	****
Esp. X Medio	1	1422.222	1422.222	14.43	0.0004	***
Esp. X AIB	2	477.777	238.8885	2.42	0.098	NS
Medio X AIB	2	77.777	38.8885	0.39	0.6759	NS
Esp. X Medio. X AIB	2	277.777	138.8885	1.41	0.2531	NS
Error	55	5422.222	98.5858545			
TOTAL	71	27977.773				

CV: 14.07

($\alpha = 0.05$)

En la Figura 35 se observa que el mayor porcentaje de enraizamiento se dio en la zarzamora (81.10%), siendo mucho menor en la frambuesa (60%).

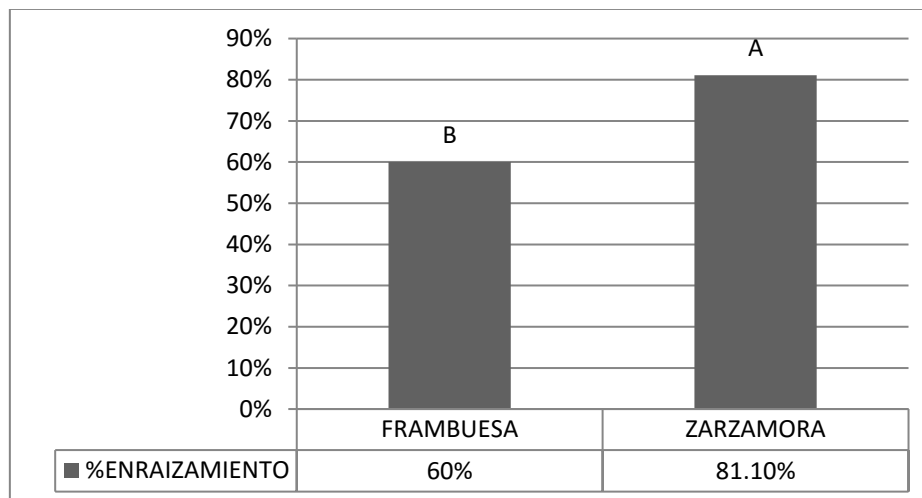


Figura 35: Respuesta en porcentaje de enraizamiento para las especies de *Rubus*.

Se confirma estadísticamente (Figura 36) que el mayor enraizamiento se dio cuando los explantes fueron sembrados sobre medio ½ MS (78.3 por ciento), siendo superior al logrado con el medio MS (62.8 por ciento).

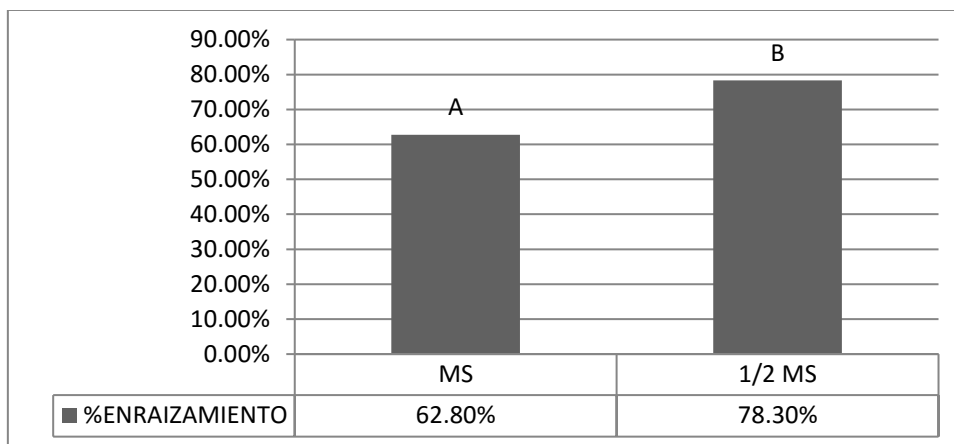


Figura 36: Respuesta en porcentaje de enraizamiento para los medios de cultivo.

Se confirma estadísticamente (Figura 37) que el mejor porcentaje de explantes enraizados se logró con la dosis de 1 mg/L de AIB (80.8 por ciento), el cual fue reduciéndose a medida disminuyó la dosis de la hormona, siendo 70 por ciento con 0.5 mg/L y 60.8 por ciento con 0 mg/L.

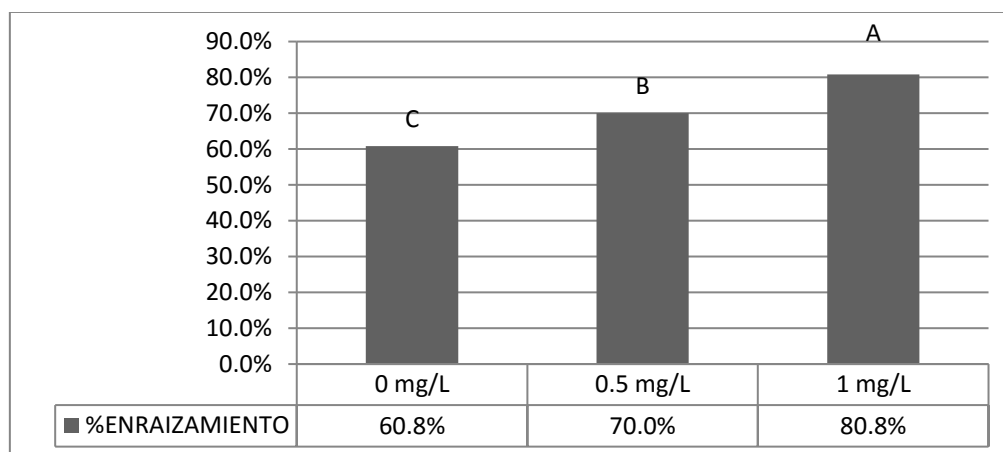


Figura 37: Respuesta en porcentaje de enraizamiento para las dosis hormonales de AIB.

En la Figura 38 se observan los resultados de la interacción especie – medio de cultivo, los cuales fueron agrupados en tres grupos con significancia diferente, siendo A el mayor formado

por la zarzamora enraizada sobre ½ MS alcanzando un porcentaje de plantas con raíces de 84.4 por ciento; el siguiente el grupo B formado por zarzamora enraizada sobre MS con 77.8 por ciento y por frambuesa enraizada en ½ MS con 72.2 por ciento , y el último grupo C formado por la frambuesa enraizada en MS, el cual logró el menor porcentaje de 47.8 por ciento.

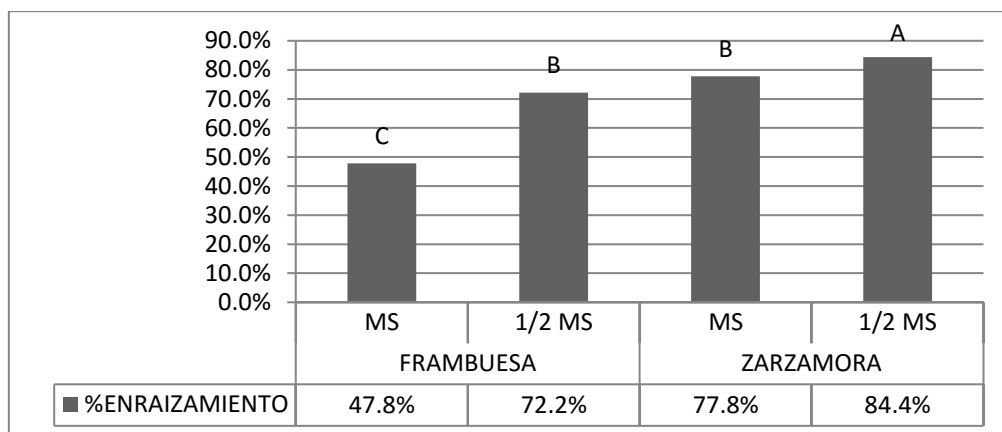


Figura 38: Respuesta en porcentaje de enraizamiento para la interacción especie – medio de cultivo.

- **Discusión:**

Como podemos observar, la formación de raíces fue posible con los dos medios de cultivo formulados y con cualquiera de las dosis hormonales de AIB suplementadas a los medios de cultivo, incluso en los medios libres de la auxina. Como se pudo observar en los resultados la reducción de sales en los medios fue una medida eficaz para optimizar el enraizamiento, hecho corroborado por las experiencias anteriores de Isac y Popescu (2009), Amalia et. al. (2014), Robres-Torres et. al. (2015). Es probable que se pueda alcanzar una mayor eficiencia reduciendo aún más la concentración tal y como hizo Bobrowski et. al. (1996) con en medio 1/3 MS según la experiencia de Hughes et. al. (2004) el porcentaje de enraizamiento es mayor cuando se emplea con los niveles más bajos de AIB tales como 0.5 y 1 mg/L. Aunque, como pudimos apreciar en los resultados, la rizogénesis en medios sin hormonas puede darse tal y como ocurrió en las experiencias de Mészáros et. al. (2005), Minas y Neocleous (2007), Clapa et. al. (2008) y Cheong et. al. (2014). Según los resultados, la formación de raíces se incrementa con el aumento de la dosis de AIB, hecho que también queda comprobado por el empleo de 0.5 mg/L en las pruebas de Stoevska et. al. (1995) y Bobrowski et. al. (1996) llegando hasta a un 100%

de explantes con raíces. Los datos que arroja el tratamiento con 1 mg/L fueron los más altos, esta dosis fue utilizada por Ostrolucká et. al. (2005) y Amalia et. al. (2014)

4.3.2. LONGITUD DE RAÍCES POR BROTE

Según al análisis de varianza general para la longitud de raíces por Brote, se muestran diferencias significativas entre la especie, el medio de cultivo, la dosis hormonal de AIB y la interacción entre la especie y la dosis hormonal de AIB a un nivel de significancia de 0.05. (Tabla 18)

Tabla 18. Análisis de varianza de la longitud de raíces por brote en la etapa de enraizamiento

F. V.	G.L.	S.C.	C.M.	F-cal	p-VALOR	Significancia
Bloque	5	3.845	0.769	1.13	0.35	NS
Especie	1	13.139	13.139	19.39	0.0001	****
Medio de Cultivo	1	18.734	18.734	27.65	0.0001	****
Dosis de AIB	2	1156.69	578.345	853.52	0.0001	****
Esp. X Medio	1	0.615	0.615	0.91	0.34	NS
Esp X AIB	2	39.574	19.787	29.20	0.0001	****
Medio. X AIB	2	3.634	1.817	2.68	0.07	NS
Esp. X Medio X AIB	2	3.639	1.8195	2.69	0.07	NS
Error	55	37.268	0.6776			
TOTAL	71	1277.138				CV: 4.61

($\alpha = 0.05$)

En la Figura 39 se observa que la zarzamora alcanzó la mayor longitud de raíces con 18.3 mm, mientras que las raíces de frambuesas lograron un tamaño menor promedio de 17.4 milímetros.

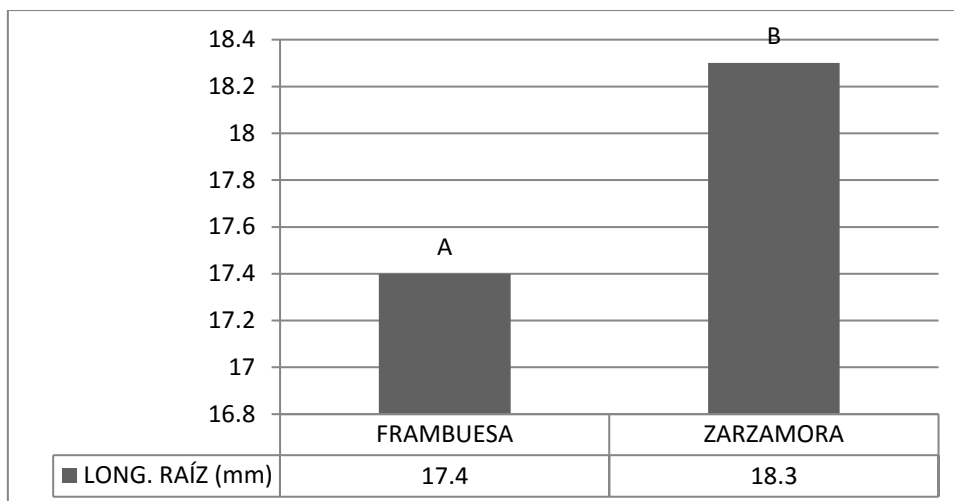


Figura 39: Respuesta en Longitud de Raíces por Brote para las especies de *Rubus*.

En la Figura 40, se puede observar que el mayor tamaño de raíces fue logrado cuando los explantes fueron sembrados sobre el medio ½ MS (18.4 mm), mientras que un tamaño ligeramente menor (17.3 mm) fue logrado con el medio MS.

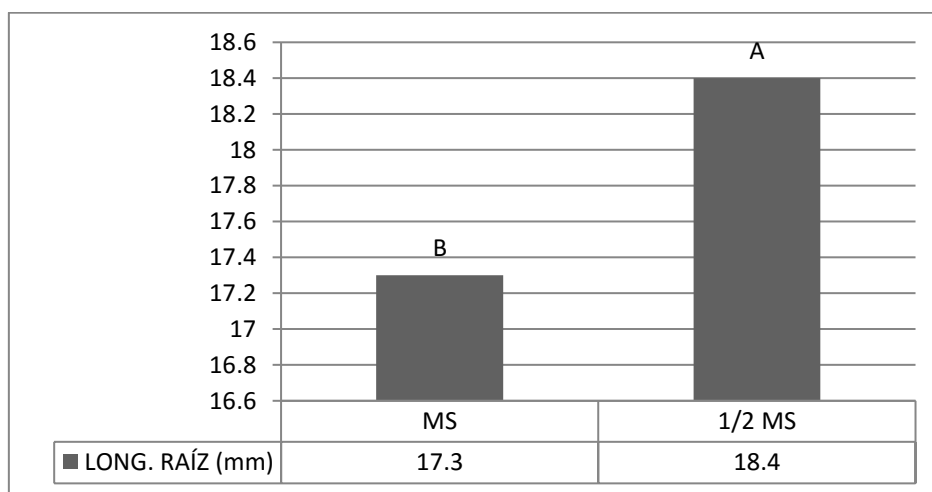


Figura 40: Respuesta en Longitud de Raíces por Brote para los medios de cultivo.

En la Figura 41 se muestra que la mayor longitud de raíces fue alcanzada con la dosis de 1 mg/L de AIB (23 mm), la cual se iba reduciendo a medida que la dosis se disminuía, siendo el segundo tamaño promedio de 17.3 mm con una dosis de 0.5 mg/L de AIB, y el menor tamaño de 13.3 mm fue alcanzado por 0 mg/L de AIB.

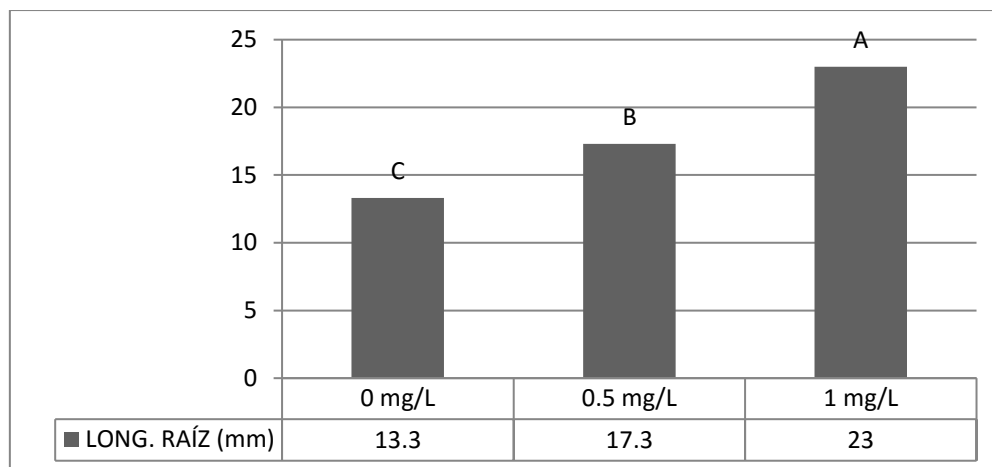


Figura 41: Respuesta en Longitud de Raíces por Brote para las dosis hormonales de AIB.

Los resultados en la interacción especie – dosis hormonal de AIB se aprecian en la Figura 42, siendo superiores aquellos alcanzados por la zarzamora y la frambuesa enraizadas sobre medios suplementados con 1 mg/L de AIB siendo 24.2 y 21.8 mm respectivamente; seguidos por la interacción con 0.5 mg/L de AIB (16.7 y 17.8 mm) y finalmente por medios sin hormona enraizante (13.9 y 12.6 mm). De esta forma se puede ver que a medida se reduce la dosis hormonal, el tamaño de raíces es menor.

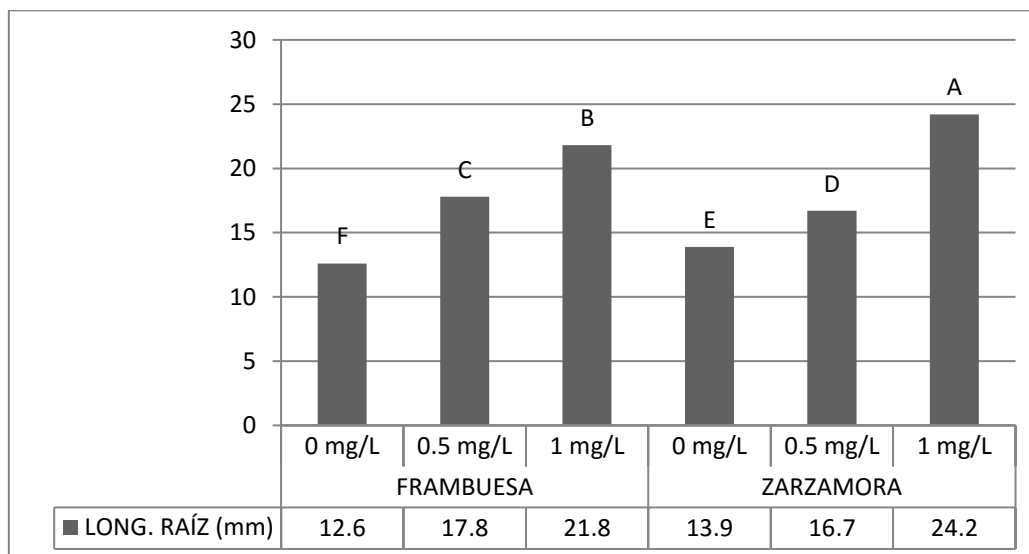


Figura 42: Respuesta en Longitud de Raíces por Brote para interacción entre especie y las dosis hormonales de AIB.

- **Discusión:**

Como se puede observar, las raíces más grandes se logran con una dosis creciente de AIB. Esta experiencia fue corroborada por Jafari y Hamidoghli (2009) que logró el mayor número de raíces (4) y una longitud de hasta 7.83 cm con 2 mg/L de AIB. Sin embargo, no se puede determinar con exactitud este hecho puesto que la mayor dosis utilizada en la tesis fue de 1 mg/L y como promedio se pudo medir hasta 23 mm como promedio de todas las raíces por cada explante.

Los medios de enraizamiento fueron todos suplementados con carbón activado tomando las experiencias de Hughes et. al. (2004) y Pesic-VanEsbroeck et. al. (2006) quienes probaron que este reactivo es esencial para la rizogénesis. Según Wu et. al. (2009) la formación de raíces se ve beneficiada con la reducción de la intensidad luminosa en el medio de cultivo, la cual se logra con el carbón activado.

4.4. ACLIMATACIÓN:

De los tres sustratos empleados para la prueba de aclimatación aquel formado por el musgo, la vermiculita y la perlita en proporciones volumétricas iguales permitió un mejor desarrollo de los brotes enraizados, después de un mes de trasplantados.

Se observó que las raíces se extendieron en todo el sustrato, sobre las hojas se aprecia venación en los tres tratamientos, el tallo principal se elongó y se presentó el desarrollo de espinas, además de la formación de un nuevo ápice caulinar. No hubo diferencia en el porcentaje de sobrevivencia en los tres tratamientos.

V. CONCLUSIONES

Ambas especies del género *Rubus* respondieron a la multiplicación *in vitro*.

La hormona más efectiva para lograr el establecimiento de las yemas en ambas especies es la de bencilaminopurina a una dosis de 1 g/L, que permitió mayor regeneración de explantes, un tamaño deseable de los brotes formados y un número aceptable de yemas por cada explante, para poder iniciar la fase de multiplicación.

El medio de enraizamiento más efectivo para ambas especies es el $\frac{1}{2}$ MS, suplementado con una dosis de 1 mg/L de AIB, logrando porcentajes de rizogénesis para frambuesa y para la zarzamora, además de una mayor longitud de raíces promedio por explante (frambuesa, 21.8 mm y zarzamora, 24.2 mm). Sin embargo los otros tratamientos pueden ser utilizados para lograr la formación de raíces, pero con una menor eficacia.

El protocolo incluye a la yema axilar como el explante más adecuado, debido a que son muy numerosas (10 a 15 yemas axilares/planta), están más disponibles y permiten regenerar rápidamente brotes con poco riesgo de oxidación.

VI. RECOMENDACIONES

Dada la envergadura del experimento, se recomienda hacer estudios futuros para cada etapa de la micropropagación, para así poder probar nuevas hormonas con un mayor número de dosis y obtener una formulación más precisa.

Para mejorar el balance auxina - citoquinina y por tanto un mayor desarrollo de brotes, se recomienda la inclusión de una baja dosis de auxinas para promover el crecimiento en las etapas previas al enraizamiento, además de suplementar con ácido giberélico los medios de establecimiento y de multiplicación.

Realizar proyectos de propagación para frambuesas y zarzamoras empleando más de tres variedades económicamente importantes, para uniformizar los parámetros de evaluación y mejorar constantemente los protocolos de multiplicación *in vitro*.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUIRRE, G; BAUDOIN, J; ARNÉZ, L. 2010. Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia. 77-86
2. AMALIA, F; DEBNATH, S; YEOUNG, Y. 2014. Effects of calcium gluconate and ascorbic acid on controlling shoot necrosis during micropropagation of primocane – fruiting raspberry (*Rubus idaeus* L.) cultivars. African Journal of Biotechnology. Vol 13(47). 4361-4368.
3. ANGELOVA, E; ARSOV, T. 2006. Investigation of different media content on meristem organization of raspberry (*Rubus idaeus*) in conditions in vitro. 271-274
4. BOBROWSKI, V; MELLO-FARIAS, P; PETERS, J. 1996. Micropropagation of blackberries (*Rubus* sp.) cultivars. Revista Brasileira de Agrociência. Vol.2, nº 1. 17-20.
5. BUSHWAY, L; PRITTS, M; HANDLEY, D. 2008. The Raspberry & Blackberry Production Guide. Natural Resource, Agriculture, and Engineering Service. 3–6.
6. CHEONG, E; JEON, A; KANG, J; MOCK, R; KINARD, G; LI, R. 2014. In vitro elimination of Black raspberry necrosis virus from black raspberry (*Rubus occidentalis*) – Short communication. 95 – 98.
7. CLAPA, D; FIRA, A; PACURAR, I. 2008. The *in vitro* propagation of the raspberry cultivar ‘Citria’. 99 -103
8. CLARK, J; STAFNE, E; HALL, H; FINN, C. 2007. Blackberry breeding and genetics. Breeding Reviews, volume 29. ISBN 978-0-470-05241-9. 20– 22.
9. COUSINEAU, J; DONNELLY, D. 1991. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of tissue cultured and greenhouse-grown raspberry. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Vol: 27. 249 – 255.

10. DAI, W; MAGNUSSON, V; HATTERMAN-VALENTI, H; CARTER, J. 2006. Micropropagation of 'Amethyst' Purple Raspberry (*Rubus occidentalis* L. x *R. idaeus* L. 'Amethyst'). Department of Plant Sciences, North Dakota State University, Fargo. 35 - 38
11. DZIADCZYK, E; DOMACIUK, M; DZIADCZYK, P; PAWELEC, I; SZCZUKA, E; BEDNARA, J. 2013. Optimization of in vitro culture conditions influencing the initiation of raspberry (*Rubus idaeus* L. cv. Nawojka) cell suspension culture. Lublin, PO, Universitatis Mariae Curie- Skłodowska. 19 - 23
12. GAJDOŠOVÁL, A; OSTROLUCKÁ, M; LIBIAKOVÁ, G; ONDRUŠKOVÁ, E; ŠIMALA, D. 2005. Microclonal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture in vitro. Eslovaquia. 106 - 111
13. GARCÍA, J; GARCÍA, G; CIORDIA, M. 2014. El cultivo del frambueso. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). 1 – 73.
14. GIASUR. 2008. Manual de Buenas Prácticas Agrarias Sostenibles de los Frutos Rojos. Manual de Buenas Prácticas Agrarias Sostenibles. Fundación Doñana 21. 79- 96
15. GRAHAM, J; JENNINGS, N. 2009. Raspberry Breeding. Breeding Plantation Tree Crops. Temperate Species. Pág: 233-248.
16. HUGUES, B; COOK, W; KEITH, C. 2004. Rooting medium composition and *in vitro* rooting and greenhouse survival of five raspberry cultivars. HortScience, Vol. 39(4). 788
17. HUMMER, K. 2010. *Rubus* Pharmacology: Antiquity to the Present. HortScience. Vol. 45(11). Pág: 1587-1591
18. ISAC. V. (2005). Studies on the interaction of some factors for raspberry (*Rubus idaeus* L.) micropropagation. COST 843 Final Conference, COST 843 and COST851 Joint Meeting. 91 – 92.
19. ISAC, V; POPESCU, A. 2009. Protocols for in vitro micropropagation of raspberry. Research Institute for Fruit Growing. University of Pitesti. 2 - 23
20. JADÁN, M; RUIZ, J; SORIA, N; MIHAI, R. 2010. Synthetic seeds production and the induction of organogénesis in blackberry (*Rubus glaucus* Benth). University of Bucharest. Romanian Biotechnological Letters, Vol. 20, No. 1. 10134 - 10142
21. JAFARI, A; HAMIDOGHLI, Y. 2009. Micropropagation of thornless trailing blackberry (*Rubus* sp.) by axillary bud explants. Australian Journal of Crop Science. Vol. 3. 191-194

22. JONES, F; FLORES, D. 2007. Establecimiento *in vitro* y pruebas preliminares de micropropagación en medio semisólido y líquido de frambuesa (*Rubus idaeus* L.). 46 - 53
23. KYTE, L; KLEYN, J. 1996. Plant from test tubes – An introduction to micropropagation. Tercera edición. Editorial Timber Press, Portland. E.E.U.U.
24. LAZIĆ, T; RUŽIĆ, Đ. 2007. Organogénesis *in vitro* from the leaf of blackberry cv Čačanska bestrna. Čačak, Serbia, Fruit Research Institute. Genetika, Vol. 39, No. 1, 69-78.
25. MENG, R; CHEN T; FINN CH; LI Y. 2004. Improving *in vitro* plant regeneration from leaf and petiole explants of ‘Marion’ blackberry. Corvallis HortScience Vol. 39(2). 316-320.
26. MÉSZÁROS, A; KÁLAI, K; HALÁSZ, K. 2005. Growth promoting effects of triacontanol in the micropropagation of horticultural plants. COST 843 Final Conference, COST 843 and COST851 Joint Meeting. 85 - 86.
27. MINAS, G; NEOCLEOUS, D. 2007. A protocol for rapid clonal micropropagation *in vitro* of primocane-fruiting red raspberry cultivars. 3-6
28. MORALES, C. 2009. El frambueso (*Rubus idaeus* L.), morfología y clasificación. Convenio de Cooperación Berries INIA – INDAP de Chile. INIA RAIHUEN. 1 – 2.
29. OSTROLUCKÁ, M; GAJDOŠOVÁ, A; LIBIAKOVÁ, G. 2005. Clonal propagation of small fruits under *in vitro* conditions. Institute of Plant Genetics and Biotechnology SAS, Akademická 2, P. COST 843 Final Conference, COST 843 and COST851 Joint Meeting. 103-104.
30. PEREZ, M; VAZQUEZ, V. (2004). Zarzamora (*Rubus* spp), su cultivo y producción en el trópico mexicano. INIFAP, CIRPAC. Campo Experimental Santiago Ixcuintia.
31. PESIC-VANESBROECK, Z; BALLINGTON, J; FERNANDEZ, G. (2008). Enhancement of Bramble Production in the Southeastern U.S. Through Micropropagation, Virus Indexing, and Field Evaluation for Trueness to Type. 1-8
32. PRITTS, M. 2003. Raspberry ad related fruits. Department of Horticulture, Cornell University’s College of Agriculture and Life Sciences. Ithaca, NY 14853. 1 – 8.
33. REED, B. 1990. Multiplication of *Rubus* Germplasm In Vitro: A Screen of 256 Accessions. 141-148
34. ROBRES-TORRES, E; LÓPEZ-MEDINA, J. ROCHA-GRANADOS, M. 2015. La elongación de brotes adventicios de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) es influenciada por brasinosteroides. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Vol.6 Núm.5. 991-999

35. SIGARROA-RIECHE, A; GARCÍA-DELGADO, C. 2011. Establecimiento y multiplicación in vitro de mora de castilla (*Rubus glaucus*) variedad sin espinas, mediante ápices meristemáticos. 347-353
36. STOEVSKA, T; TRIFONOVA, A; KARADOCHEVA, D. 1995. Micropropagation of Raspberries (*Rubus idaeus*). 27-30
37. TSAO, C; POSTMAN, J; REED, B. 2000. Virus infections reduce in vitro multiplication of 'Malling Landmark' raspberry. Society for In Vitro Biology. In Vitro Cell. De. Hiol.-Plant. Vol. 36. 65 - 68.
38. TURK, B; SWARTZ, H; ZIMMERMAN, R. 1994. Adventitious shoot regeneration from in vitro-cultured leaves of *Rubus* genotypes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Vol. 38. 11-17
39. VUJOVIĆ, T; RUŽIĆ, Đ; CEROVIĆ, R; MOMIROVIĆ, G. 2010. Adventitious regeneration in blackberry (*Rubus fruticosus* L.) and assessment of genetic stability in regenerants. Plant Growth Regul. Vol. 61. 265–275.
40. WAUGH, R; VAN DE VEN, W; PHILLIPS, M; POWELL, W. 1990. Chloroplast DNA diversity in the genus *Rubus* (Rosaceae) revealed by Southern hybridization. Plant Systematics and Evolution. Vol. 172, No. 1/4. 65 - 75.
41. WU, J; MILLER, S; HALL, H; MOONEY, P. 2009. Factors affecting the efficiency of micropropagation from lateral buds and shoot tips of *Rubus* Plant Cell Tissue Organ Cult. Springer Science + Business Media B.V. Vol. 99. 17 – 25
42. ZAWADZKA, M; ORLIKOWSKA, T. 2006. Factors modifying regeneration in vitro of adventitious shoots in five red raspberry cultivars. 105 – 115.

Anexo 1: Etapa de establecimiento. Yema axilar después de cuatro días de sembrada libre de contaminantes (Izquierda). Brote de un mes de regenerado sobre el nudo de la yema axilar (derecha)



Anexo 2: Brote sobre nudo axilar después de una semana (izquierda) y luego de un mes (derecha) de ser sembrado en medio MS + 0.1 g/L de carbón activado



Anexo 3: Brote después de un mes de ser sembrado en medio de multiplicación MS + 0.1 g/L de carbón activado y 1 mg/L de bencilaminopurina



Anexo 4: Multiplicación de brotes provenientes de la yema axilar, se aprecia el empleo de bisturí y pinzas para realizar la selección.



Anexo 5: Brote seccionado y sembrado en medio de multiplicación (MS + 0.1 g/L de carbón activado + 1 mg/L de BAP)



Anexo 6: Brote enraizado en medio 1/2 MS + 1 mg/L de AIB + 0.1 g/L de carbón activado



Anexo 7: Plántula aclimatada (izquierda) y completamente adaptada a la vida al exterior, se aprecian las nervaduras y el desarrollo de espinas en los tallos.



