

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**“MICROPROPAGACIÓN *in vitro* DE ZARZAMORA (*Rubus* L. Subg. *Eubatus* (Focke) Focke) cv. ‘MARIONBERRY’ A PARTIR DE MICROESTACAS”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGA**

**SALLY PAOLA CANGALAYA LIRA**

**LIMA – PERÚ**

**2020**

---

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación  
(Art. 24 – Reglamento de propiedad Intelectual)**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“MICROPROPAGACIÓN *in vitro* DE ZARZAMORA (*Rubus L. Subg. Eubatus*  
(Focke) Focke) cv. ‘MARIONBERRY’ A PARTIR DE MICROESTACAS”**

**Presentada por:**

**SALLY PAOLA CANGALAYA LIRA**

**Tesis para Optar el Título Profesional de:**

**BIÓLOGA**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente Jurado:**

---

**Mg. Sc. Abelardo Ciro Calderón Rodríguez**  
**PRESIDENTE**

---

**Mg. Sc. María de Lourdes Tapia y Figueroa**  
**MIEMBRO**

---

**Dr. Jorge Jiménez Dávalos**  
**MIEMBRO**

---

**Dra. Antonietta Ornella Gutiérrez Rosati**  
**ASESORA**

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, Sofía Lira Valdéz y Félix Cangalaya Baldeón por darme todo su apoyo, comprensión y cariño.*

*A mis hermanas, Mónica y Carla por brindarme la ayuda necesaria para continuar y ser mi soporte.*

## AGRADECIMIENTO

*Agradezco a la Dra. Antonietta Gutiérrez Rosati por la confianza y la oportunidad de poder desarrollar la tesis en el laboratorio CIRGEBB y de realizarme como profesional.*

*Agradezco al equipo CIRGEBB, Elvis Rimachi, Yngrid De La Cruz, Ángel Rojas, Nila Huamaní y al Sr. Edson, por su apoyo en los momentos que los necesité en el trabajo de investigación*

*Y a todas las personas que en el camino fueron de gran ayuda para realización de este trabajo.*

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN .....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>viii</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>5</b>
2.1. Generalidades de los berries.....	5
2.2. Generalidades del género <i>Rubus</i> .....	6
2.3. Posición Taxonómica .....	7
2.4. Descripción botánica .....	8
2.5. Cultivo y Producción.....	11
2.6. Variedades .....	11
2.7. Cultivar “Marionberry” .....	12
2.8. Características botánicas .....	13
2.9. Zonas de crecimiento.....	13
2.10. Medios de cultivo .....	14
2.10.1. Macro y Micronutrientes .....	14
2.10.2. Vitaminas y Aminoácidos .....	14
2.10.3. Reguladores de crecimiento.....	15
2.11. Cultivo <i>in vitro</i> de micro-estacas.....	16
2.11.1. Etapas del cultivo de estacas <i>in vitro</i> .....	17
<b>III. METODOLOGÍA .....</b>	<b>20</b>
3.1. Materiales .....	20
3.1.1. Medios de cultivo .....	20
3.1.2. Material vegetal .....	21
3.1.3. Hormonas vegetales.....	21
3.1.4. Sustancias desinfectantes.....	21
3.1.5. Instrumentos, materiales y equipos de laboratorio .....	21
3.2. Metodología.....	21
3.2.1. Colección del material vegetal .....	21
3.2.2. Preparación de medios de cultivo .....	22
3.2.3. Fase de desinfección.....	22
3.2.4. Fase de establecimiento .....	22
3.2.5. Fase de Micropropagación.....	23

3.3. Estadística.....	24
3.3.1. Variables de evaluación.....	24
3.3.2. Variables respuesta.....	24
3.3.3. Diseño Experimental .....	25
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>27</b>
4.1. Resultados .....	27
4.1.1. Establecimiento .....	27
4.1.2. Micropropagación.....	29
4.1.3. Análisis de resultados .....	35
4.2. Discusiones.....	37
4.2.1. Establecimiento .....	37
4.2.2. Micropropagación.....	39
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>43</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>44</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>45</b>
<b>VIII. ANEXOS .....</b>	<b>57</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Estacionalidad de frambuesa y zarzamora .....	3
Tabla 2: Clasificación taxonómica .....	7
Tabla 3: Los 12 subgéneros de Focke de Rubus (1910-1914) .....	8
Tabla 4: Medios de establecimiento .....	23
Tabla 5: Tratamientos .....	24
Tabla 6: Gráficos de barras de la longitud del tallo.....	58
Tabla 7: Datos descriptivos .....	59
Tabla 8: Análisis de Varianza.....	59
Tabla 9: Modelo Lineal .....	60
Tabla 10: Comparación múltiple entre los diferentes medios de cultivo utilizando el método Sidak-Bonferroni. ....	61
Tabla 11: Gráficos de barras de número de hojas vivas. ....	62
Tabla 12: Datos descriptivas.....	62
Tabla 13: Análisis de Varianza.....	63
Tabla 14: Modelo lineal.....	63
Tabla 15: Comparación múltiple entre los diferentes medios de cultivo utilizando el método Sidak-Bonferroni. ....	65
Tabla 16: Gráfico de barras del número de raíces .....	66
Tabla 17: Datos descriptivos .....	66
Tabla 18: Análisis de varianza.....	67
Tabla 19: Modelo lineal.....	68
Tabla 20: Comparación múltiple entre los diferentes medios de cultivo utilizando el método Sidak-Bonferroni. ....	69
Tabla 21: Gráfico de barras de la longitud de tallo .....	70
Tabla 22: Datos descriptivos .....	70
Tabla 23: Análisis de varianza.....	71
Tabla 24: Modelo lineal.....	72
Tabla 25: Comparación múltiple entre las diferentes medios de cultivo utilizando el método Sidak-Bonferroni. ....	73
Tabla 26: Gráfico de barras del número de brotes.....	74
Tabla 27: Datos descriptivos .....	74
Tabla 28: Análisis de varianza.....	75

Tabla 29: Modelo lineal.....	76
Tabla 30: Comparación múltiple entre las diferentes medios de cultivo utilizando el método Sidak-Bonferroni. ....	77
Tabla 31: Gráficos de barras.....	78
Tabla 32: Datos descriptivos .....	78
Tabla 33: Análisis de varianza.....	79
Tabla 34: Modelo lineal.....	80
Tabla 35: Comparación múltiple entre las diferentes medios de cultivo utilizando el método Sidak-Bonferroni. ....	81
Tabla 36: Gráfico de barras del número de hojas vivas .....	82
Tabla 37: Datos descriptivos .....	82
Tabla 38: Análisis de varianza.....	83
Tabla 39: Modelo lineal.....	84
Tabla 40: Comparación múltiple entre las diferentes medios de cultivo utilizando el método Sidak-Bonferroni. ....	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Plántulas de zarzamora, cultivar Maryonberrie: fase de establecimiento. A: WP a 45 días; B: WP a 90 días; C: WP a 120 días; D: MS a 45 días; E: MS a 90 días; F: MS a 120 días. ....	28
Figura 2: Raíces en fase establecimiento A: WP a 45 días; B: WP a 90 días; C: WP a 120 días; D: MS a 45 días; E: MS a 90 días; F: MS a 120 días.....	28
Figura 3: Longitud de tallo a los 45 días: Control (WP); T6 (IBA 0.5+GA 3 1.0). A los 45 días.....	30
Figura 4: Longitud de tallo a los 90 días Control (WPM); T2 (IBA 0.5 ppm); T6 (IBA 0.5+GA 3 1.0).....	30
Figura 5: Longitud de tallo a los 120 días: Control (WP); T2 (IBA 0.5 ppm); T5 (ANA 0.75+GA3 1.0).....	31
Figura 6: Número de brotes en plántulas desarrolladas en el medio T4 (BAP 1.0+GA3 0.5) a los 45, 90 y 120 días. ....	32
Figura 7: Número de raíces a los 45 días Control (WP); T2 (IBA 0.5 ppm). A los 45 días.....	33
Figura 8: Número de raíces a los 90 días Control (WP): T1 (ANA 0.75 ppm).....	34
Figura 9: Número de raíces a los 120 días Control (WP); T1 (IBA 0.5 ppm). ....	34
Figura 10: Tratamiento T10 (WP + IBA 2.00 ppm) a los 60 días.....	36
Figura 11: Plántulas a los 45 días de ser sembradas en medio MS ½. ....	86
Figura 12: Raíces de las plántulas a los 45 días. ....	86
Figura 13: Plántulas a los 45 días de ser sembradas en medio MS. ....	87
Figura 14: Raíces de las plántulas a los 45 días. ....	87
Figura 15: Plántulas a los 45 días de ser sembradas en medio WP. ....	88
Figura 16: Raíces de las plántulas a los 45 días. ....	88
Figura 17: Plántulas a los 45 días de ser sembradas en medio WP+ANA 0.05 ppm. ....	89
Figura 18: Raíces de las plántulas a los 45 días. ....	89
Figura 19: Plántulas a los 45 días de ser sembradas en medio MS1/2. ....	90
Figura 20: Raíces de las plántulas a los 90 días. ....	90
Figura 21: Plántulas a los 45 días de ser sembradas en medio MS. ....	91
Figura 22: Raíces de las plántulas a los 90 días. ....	91
Figura 23: Plántulas a los 90 días de ser sembradas en medio WP. ....	92
Figura 24: Raíces de las plántulas a los 90 días. ....	92

Figura 25: Plántulas a los 90 días de ser sembradas en medio WP+ANA 0.5 ppm. ....	93
Figura 26: Raíces de las plántulas a los 90 días. ....	93
Figura 27: Plántulas a los 120 días de ser sembradas en medio MS1/2. ....	94
Figura 28: Plántulas a los 120 días de ser sembradas en medio MS. ....	94
Figura 29: Plántulas a los 120 días de ser sembradas en medio WP. ....	95
Figura 30: Plántulas a los 120 días de ser sembradas en medio WP+ANA 0.05 ppm. ....	95
Figura 31: ANA 0.75 ppm a los 45 días .....	96
Figura 32: IBA 0.5 ppm a los 45 días.....	96
Figura 33: GA3 1.0 ppm a los 45 días .....	97
Figura 34: BAP 1.0 ppm+GA3 0.5 ppm a los 45 días.....	97
Figura 35: ANA 0.75 ppm + GA3 1.0 ppm a los 45 días .....	98
Figura 36: IBA 0.5 ppm + GA3 1.0 ppm a los 45 días.....	98
Figura 37: BAP 2.0 ppm + ANA 0.1 ppm + GA3 0.2 ppm a los 45 días.....	99
Figura 38: BAP 1.0 ppm + IBA 0.1 ppm + GA3 0.1 ppm a los 45 días .....	99
Figura 39: ANA 0.75 ppm a los 90 días .....	100
Figura 40: IBA 0.5 ppm a los 90 días.....	100
Figura 41: GA3 1.0 ppm a los 90 días .....	101
Figura 42: BAP 1.0 ppm + GA3 0.5 ppm a los 90 días.....	101
Figura 43: ANA 0.75 ppm + GA3 1.0 ppm a los 90 días.....	102
Figura 44: IBA 0.5 ppm + GA3 1.0 ppm a los 90 días.....	102
Figura 45: BAP 2.0 ppm + ANA 0.1 ppm + GA3 0.2 ppm a los 90 días.....	103
Figura 46: BAP 1.0 ppm + IBA 0.1 ppm + GA3 0.1 ppm a los 90 días .....	103
Figura 47: ANA 0.75 ppm a los 120 días .....	104
Figura 48: IBA 0.5 ppm a los 120 días.....	104
Figura 49: GA3 1.0 ppm a los 120 días .....	105
Figura 50: BAP 1.0 ppm + GA3 0.5 ppm a los 120 días.....	105
Figura 51: ANA 0.75 ppm + GA3 1.0 ppm a los 120 días .....	106
Figura 52: IBA 0.5 ppm + GA3 1.0 ppm a los 120 días.....	106
Figura 53: BAP 2.0 ppm + ANA 0.1 ppm + GA3 0.2 ppm a los 120 días.....	107
Figura 54: BAP 1.0 ppm + IBA 0.1 ppm + GA3 0.1 ppm a los 120 días .....	107

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Tablas y gráficos estadísticos de la Etapa de establecimiento.....	58
Anexo 2: Tablas y gráficos estadísticos de la etapa de micropropagación .....	70
Anexo 3: Fotografías de la Etapa de establecimiento.....	86
Anexo 4: Fotografías de la Etapa de micropropagación.....	96

## RESUMEN

Se desarrollaron protocolos para el cultivo *in vitro* de una variedad mejorada de zarzamora, cultivar 'Marionberry'. Para la etapa de introducción se estableció un protocolo de desinfección que consiste en el lavado de las estacas con jabón carbónico, suspensión en hipoclorito de sodio al 2 por ciento y tween 20, por 20 minutos y por último el enjuague con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar.

Para encontrar un medio de establecimiento se probaron diferentes medios de cultivo, WP, WP+ANA 0.5, MS y MS1/2, siendo el medio de WP quien obtuvo mejores resultados en cuanto a las variables evaluadas que fueron: Longitud de tallo, número de hojas vivas y número de raíces.

Posteriormente, al desarrollar un medio de establecimiento se prepararon diferentes medios para la etapa de micropropagación, la composición de los medios tuvieron hormonas vegetales a diferentes concentraciones y combinaciones entre ellas tales como, Bencil amino purina (BAP), Ácido Naftalenacético (ANA), Ácido Indol butírico (IBA) y ácido giberélico (GA3). Dependiendo de los resultados de las variables: Longitud de tallo, número de hojas verdes, número de brotes y número de raíces, se determinó que el medio (T4) cuya composición fue medio WP suplementado con BAP 1.0 ppm + GA3 0.5 ppm, fue el más óptimo. Se Desarrolló un último tratamiento que consistía en el suplemento de WP con Ácido indol butírico (IBA) 2.0 ppm, el cual tubo mejores resultados ya que los tallos que desarrolló se mostraban más gruesos y vigorosidad general.

**Palabras clave:** Zarzamora, micropropagación, Bencil amino purina (BAP), Ácido indol butírico (IBA) 2.0 ppm.

## ABSTRACT

In this study, *in vitro* culture protocols of an improved blackberry variety, "Marionberry", were developed. For the introduction stage, the disinfection protocol consisted of the following steps: washing stakes with carbonic soap, suspension in 2 percent sodium hypochlorite and tween 20, for 20 minutes and finally rinsing with sterile distilled water inside the Laminar flow chamber.

In order to find a medium of establishment, different culture media were tried: WP, WP + ANA 0.5, MS and O MS1 / 2. From these media, WP medium obtained the best results in terms of the evaluated variables that were: Stem length, number of live leaves and number of roots.

Subsequently, different media were prepared for the multiplication stage. The composition of the media had plant hormones at different concentrations and combinations among them, such as Benzyl amino purine (BAP), Naphthalenacetic Acid (ANA), Butyric Indole Acid (IBA) and gibberellic acid (GA3). Depending on the results of the variables: Stem length, number of green leaves, number of bud and number of roots, the medium (T4) was the Most optimum. The composition of this medium consisted in WP medium supplemented with BAP 1.0 ppm + GA3 0.5 ppm. Finally, a last treatment with WP supplemented with IBA 2.0 ppm was developed, which showed better results because produced thicker stems with vigorous growth.

**Keywords:** Blackberry, micropropagation, benzyl amino purine (BAP), indole butyric acid (IBA) 2.0 ppm.

## I. INTRODUCCIÓN

La zarzamora pertenece a la familia Rosácea, género *Rubus*, es considerada comercialmente dentro del grupo de los berries (bayas), aun cuando su fruto no sea una baya, al igual que la frambuesa, y la grosella.

La zarzamora es nativa de Norte América y Sudamérica, Europa, Asia, y está distribuida ampliamente excepto en regiones polares (Pritts *et al.*, 1989). Los mayores productores de zarzamora son Europa y Norte América (USA y México), siendo Estados Unidos de Norte América el mayor productor en el mundo (Strik *et al.*, 2006).

Los híbridos de zarzamora con frambuesa generalmente se han desarrollado de forma no intencional. La mayoría se han encontrado en parcelas o en el medio silvestre, lugares en donde la frambuesa roja fue cultivada con la zarzamora (Finn y Strik, 2014).

‘Marionberry’ es un cultivar proveniente del estado de Óregon, condado Marion, fue denominado de esta manera por consumidores y vendedores, y ha sido el cultivar dominante desde los años 80’s. En 1948, ‘Marion’ fue seleccionado por G.F. Waldo de un cruce de los cultivares ‘Chehalem’ y ‘Olallie’ hecho en 1945 (Waldo, 1957), realizado por el programa cruza del departamento de Agricultura de los Estados Unidos (en inglés, United States Department of Agriculture)- Agricultural Research Service (USDA-ARS) en cooperación con la Universidad Estatal de Óregon. La genealogía de ‘Marion’ causa una gran confusión entre los consumidores y científicos debido a que es muy diverso. Este cultivar tiene la peculiaridad de poseer una alta calidad de fruto en cuanto a sabor, dulzor y aroma.

Las Zarzamoras son altamente nutritivas, contienen mucha fibra soluble, vitaminas y minerales. Por lo general los berries contienen altos niveles de antioxidantes y sustancias naturales que son anticancerígenos (prevención del cáncer) (Bushwey *et al.*, 2008).

La demanda de la fruta es alta ya que se caracteriza por su sabor exótico, valor nutritivo y ductilidad, en consecuencia, su procesamiento a nivel industrial es manejable y se pueden obtener diversos productos, como yogurt, mermeladas, jugos, extractos, etc. Sin embargo, la dificultad que presenta es que la oferta de fruta fresca es frecuentemente baja en el mercado debido a que tanto frambuesas como zarzamoras pueden ser difíciles de crecer y porque la fruta es bastante delicada.

Dos de los mayores inconvenientes de producción para la zarzamora son el bajo porcentaje de brotación y la baja resistencia al frío. El resultado de diversos factores incluyendo lesiones por frío, baja exposición de luz, enfermedades y la competencia por nutrientes pueden ser consecuencia de la escasez de brotes (Cortell y Strik, 1997).

Los frutos de los arándanos, frambuesas y zarzamoras, pretenden conquistar nuevos mercados internacionales ya que surgen como alternativa productiva para los agricultores peruanos. Recientemente se les ha prestado mucha atención por sus beneficios a la salud y por ende comercialmente. Con el auge actual en el uso de la fruta de la zarzamora ligado a la nutrición humana, se han llevado a cabo numerosos estudios, tanto con carácter científico y tecnológico, así como mercadológicos (Coronado *et al.*, 2014).

A pesar del valor que tienen las frambuesas y zarzamora en el mercado externo, Perú no tiene una cultura de consumo de zarzamora o frambuesas, lo que ha llevado a desalentar su producción, a pesar de que el clima y la geografía le es favorable.

En el año 2014, Sierra Exportadora lanzó el Programa Perú Berries, con el fin de introducir el cultivo de diversos berries en Perú, en especial los arándanos y frambuesas ya que cuenta con condiciones agroclimáticas en varios de sus pisos ecológicos. Asimismo debido a que estos cultivos otorgan alta rentabilidad y estacionalidad de cosecha que se da entre los meses de setiembre y octubre, justo cuando dejan de producir los países de Norte América, en donde existe alta demanda. Es decir, Perú cuenta con una ventana de contra-estacionalidad para exportación (Tabla 1).

**Tabla 1: Estacionalidad de frambuesa y zarzamora**

Proveedor	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
Estados Unidos												
• California					X	X	X	X	X	X	X	
• Washington						X	X	X				
• Óregon						X	X	X				
Canadá												
México	X	X	X	X						X	X	X
Guatemala	X	X	X	X						X	X	X
Chile	X	X	X	X	X					X	X	X
Perú									X	X		

Nota: La estacionalidad de zarzamoras y frambuesas principalmente de los países proveedores como Estados Unidos (California, Washington, Óregon), Canadá, México, Guatemala y Chile, todos ellos compiten con Perú, sin embargo, tiene ventaja sobre los demás ya que el periodo de cosecha se adelanta un mes frente a otros países como México, Guatemala y Chile. Esta tabla ha sido adaptada de “El mercado mundial de la frambuesa y la zarzamora” por Muñoz, M.y Juárez, M. 2006.

En específico, tanto frambuesas como zarzamoras, han despertado en Perú un interés en beneficio por su producción interna y exportación, así como el arándano que según Velásquez Tuesta, resaltó el incremento el 2015 con más de US\$ 94 millones (Sierra Exportadora, 2016), al igual que el gerente general de Sierra Exportadora, Miguel Cordano Rodríguez, estimó que si la producción de arándanos, también llamados blueberries, mantiene su actual ritmo de crecimiento, este año la exportación podría superar los US\$ 200 millones (El Comercio, 2016).

Actualmente los principales mercados de frambuesas y moras peruanas se encuentran en Nueva Zelanda, Holanda, Italia, Reino Unido y Francia. “Con este panorama, las exportaciones de frambuesas y zarzamoras están mostrando señales de crecimiento que ayudarían a diversificar la cartera exportadora. En los cuatro primeros meses del año, el valor de los envíos sumó US\$ 19,883, cifra que se aproxima a lo registrado en el 2017 (US\$ 20,000), y que podría aumentar mucho más al cierre del 2019”, afirmó Carlos Posada, director ejecutivo del Idexcam (Perú 21, 2019).

Para disponer de material vegetal con calidad certificada es importante la práctica de tecnologías a nivel de laboratorio, como el cultivo de tejidos, que asegure la obtención uniforme de plantas en forma masiva (Del solar, 1985), tecnología utilizada en el mejoramiento genético, la introducción de especies y variedades y la obtención de plantas libres de virus y otros patógenos y la micropropagación de material élite. Con la ayuda de esta última técnica será posible multiplicar rápidamente grandes cantidades de zarzamora; de la cual sólo existen pocos individuos; a bajo costos y en tiempos económicamente rentables.

De acuerdo a lo anterior, el objetivo principal de la siguiente investigación es Desarrollar Protocolos eficientes para el establecimiento, multiplicación y enraizamiento, de Zarzamora (*Rubus* L. Subgénero *Eubatus* (Focke) Focke) cv. 'Marionberry' a condiciones *in vitro*. Y los objetivos específicos son, obtener la composición del medio de cultivo adecuado para el desarrollo óptimo de plántulas *in vitro* , mediante la adición de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (BAP, ANA, IBA y AG3), lograr plántulas que sean capaces de ser propagadas masivamente a nivel *in vitro*, al desarrollar una buena etapa de multiplicación, conseguir plántulas que tengan un óptimo desarrollo de raíces para continuar etapas posteriores al cultivo *in vitro*.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. Generalidades de los berries**

Los berries, también conocidos como bayas o frutos del bosque, son un tipo de frutas pequeñas y comestibles que tradicionalmente no se cultivaban, sino que crecían en forma silvestres. En lenguaje común, se llaman frutas del bosque a las frutitas pequeñas, dulces (o ácidas), jugosas e intensamente coloreadas sacadas de arbustos silvestres. La mayoría son comestibles, aunque algunas son venenosas. Sus fuertes colores se deben a la presencia de pigmentos sintetizados por la planta. Algunas investigaciones han descubierto propiedades medicinales de los polifenoles pigmentados, como flavonoide, antocianina, tanino y otros fitoquímicos localizados principalmente en la piel de los frutos y semillas. Muchos frutos del bosque tienen pigmentos antioxidantes con alta capacidad de absorción de radicales de oxígeno (“ORAC”) entre alimentos vegetales.

El contenido de propiedades beneficiosas para la salud humana ha convertido a los berries en el producto de moda en lo que va de esta década, de manera que su consumo mundial registra un aumento creciente al ser catalogados como un alimento funcional con excelentes propiedades nutritivas y terapéuticas, además de presentar colores, formas y sabores muy atractivos.

El mercado global de berries es altamente competitivo y se enfoca en lograr un abastecimiento global durante todo el año. Asimismo, este mercado es versátil y los berries pueden ser utilizados no sólo como fruta fresca, sino también como productos secos, extractos, alimentos procesados (helados, postres, dulces), jugos y bebidas, aceites y otros ingredientes altamente especializados (Romero, 2016).

## 2.2. Generalidades del género *Rubus*

Sudsuki (1992), indica que las Rosáceas constituyen una familia de gran importancia debido al s gran número de plantas leñosas, herbáceas y arbustivas que la integran, además es muy importante por sus árboles y arbustos frutales, así como también, por las numerosas especies de valor ornamental.

*Rubus* es uno de los géneros más extensos de la familia Rosaceae que incluye un estimado de 900 a 1000 especies que están distribuidas en varios ecosistemas (Thompson, 1997), excepto en zonas desérticas. *Rubus* desarrolló muchas variaciones en forma de hoja, color de fruta, masa de semilla, y hábito de crecimiento (Hummer, 1996).

El número básico de cromosomas de *Rubus* es siete ( $X=7$ ) y su rango de ploidía va desde diploide ( $2n=2X=14$ ) hasta  $2n=14X=98$  o también  $2n=18X=126$  (Thompson, 1997, Jennings, 1988). La mayoría de las frambuesas son diploides a comparación de las zarzamoras cuya ploidia tiene un amplio rango y los incluye impares ( $3X$ ,  $5X$ , o  $7X$ , etc.) y aneuploides ( $6X+2$ ,  $8X-3$ , etc.) (Thompson, 1995b).

En los programas de mejoramiento de zarzamoras y frambuesas, conocer el nivel de ploidía de los genotipos de *Rubus* es esencial para predecir el éxito del cruce y combinaciones parentales que podrían producir progenies problemáticas. Para el mejoramiento del germoplasma, el nivel de ploidía también puede servir como un rasgo taxonómico distintivo valioso cuando se evalúan las colecciones de *Rubus* (Thompson, 1995a y Thompson, 1995b).

En el noroeste del Pacífico, el nativo *R. ursinus* Cham. y Schldl. Está ampliamente distribuida y ha sido un valioso recurso genético para desarrollar cultivares de zarzamoras (Finn *et al.*, 1997). *Rubus ursinus* tiene un nivel conocido de ploidía de hexaploide a dodecaploide excepto para septaploide (Brown, 1943). En 1993, *R. ursinus* fue recolectado de todo el noroeste del Pacífico y establecido en un jardín común en Corvallis, Óregon (Anderson & Finn, 1996). Estas poblaciones fueron evaluadas para características hortícolas y taxonómicas y se identificaron individuos superiores. Para incorporar este material de forma más efectiva en germoplasma erecto, semierecto y de arrastre de mora, sería útil conocer el nivel de ploidía de los genotipos seleccionados.

Las especies más conocidas son *Rubus idaeus* (frambuesa), *Rubus occidentalis* (mora cultivada) y *Rubus folius* (zarzamoras) (Roveda *et al.*, 2008).

Las plantas de *Rubus* que tienen mayor número de cromosomas que aquellas diploides presentan inestabilidad mitótica. Las células mitóticamente inestables tienen más de dos fases de metafase, cada una con su propio huso (Tsao, 1999). Es por eso que *Rubus* tiene dificultades al momento de realizar las cruces.

Se caracterizan por presentar tallos espinosos como los rosales, también llamados zarzas, pero este nombre se aplica para especies trepadoras como las zarzamoras y las moras, pero no para las frambuesas debido a que estas presentan tallos erectos (García, 2013).

### 2.3. Posición Taxonómica

De acuerdo con el departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (USDA por sus siglas en inglés) (Natural Resources Conservation Service (Plants Database) clasifican botánicamente a la zarzamora de la siguiente forma.

**Tabla 2: Clasificación taxonómica**

REINO	Plantae
SUBREINO	Tracheobionta
SUPERDIVISION	Spermatophyta
DIVISION	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida- Dicotiledoneas
SUBCLASE	Rosidae
ORDEN	Rosales
FAMILIA	Rosaceae
GENERO	<i>Rubus</i> L.
SUBGENERO	<i>Eubatus</i>

Nota: Clasificación taxonómica de *Rubus* L. Subg. *Eubatus* (Focke) Focke. Tabla adaptada de Clasificación desde el reino Plantae hasta género *Rubus* L. en inglés "Classification for Kingdom Plantae Down to Genus *Rubus* L." por United States Department of Agriculture, USDA. S.f.

La más reciente clasificación taxonómica global de *Rubus* (Focke, 1910, 1911, 1914) incluye aproximadamente 429 especies en 12 subgéneros, siendo los más representativos *Idaeobatus* (frambuesas, 117 especies), *Malachobatus* (115 especies principalmente asiáticas), y *Rubus* (= *Eubatus*: zarzamoras, aproximadamente 132 especies).

Jennings (1988) resume el aspecto taxonómico para la clasificación de zarzamora, de la siguiente manera; esta especie pertenece a los siguientes subgéneros: *Eubatus*, *Caesii*, *Suberecti*, *Corylifolii*. *Eubatus* es el subgénero más complejo y comprende dos secciones: *Moriferi* y *Ursini*. Las especies de *Moriferi* son nativas de Europa y Asia; mientras que las de *Ursini* son nativas de Norteamérica (Daubeny, 1996). La complejidad de *Eubatus* y subgéneros relacionados es debido a la diversidad de la poliploidía, subsexualidad y derivados híbridos, según Jennings (1988). Ver Tabla 5.

**Tabla 3: Los 12 subgéneros de Focke de *Rubus* (1910-1914)**

Subgenus 1	<i>Chamaemorus</i>	1 species	<i>R. chamaemorus</i> L., the cloudberry
Subgenus 2	<i>Dalibarda</i>	5 species	No pomological value
Subgenus 3	<i>Chamaebatus</i>	5 species	No pomological value
Subgenus 4	<i>Comaropsis</i>	2 species	No pomological value
Subgenus 5	<i>Cylactis</i>	14 species	Arctic berries including <i>R. arcticus stellatus</i> Sm.
Subgenus 6	<i>Orobatus</i>	19 species	Probably related to subgenus 1 ( <i>Chamaemorus</i> )
Subgenus 7	<i>Dalibardastrum</i>	4 species	No pomological value (Asia)
Subgenus 8	<i>Malachobatus</i>	114 species	No pomological value; some are ornamentals
Subgenus 9	<i>Anoplobatus</i>	6 species	(Flowering raspberries)
Subgenus 10	<i>Idaeobatus</i>	200 species	Raspberries
Subgenus 11	<i>Lampobatus</i>	10 species	No pomological value
Subgenus 12	<i>Eubatus</i>	Very large number of species	Blackberries

*Nota:* Esta tablas ha sido adaptada de “Biotechnology of Fruit and Nut Crops” por Litz, Richard E. 2005. Y también adaptado de Blackberries. In: Raspberries and blackberries: Their breeding, disease and growth. Academic Press por Jennings (1988).

#### 2.4. Descripción botánica

Las zarzamoras es un grupo muy diverso de plantas florales del género *Rubus* como se muestra en la Tabla 5. Este género es miembro de la familia de las rosáceas, el cual contiene otros géneros de cualidades hortícolas como manzanas, peras, cherries, duraznos y fresas (Iezzoni & Pritts, 1991).

Existen diferencias morfológicas entre *Idaeobatus* (frambuesas) y *Eubatus* (zarzamoras), subgéneros; el criterio comúnmente utilizado para su clasificación es el método de separación del fruto maduro de la planta. En la frambuesa el fruto es un agregado de pequeñas drupeolas que se separan del receptáculo y tiene la apariencia de un dedal. En contraste, las drupeolas de las zarzamoras se encuentran unidas al receptáculo, el cual se vuelve en una parte comestible del fruto (Hedrick, 1925, Galleta & Violette, 1989).

De acuerdo con López (2009), la parte perenne de zarzamora es la raíz la corona, de la cual se originan las cañas. En este sentido se clasifican de distintas formas de acuerdo a su edad. Primocañas: Son cañas que emergen durante la primavera, crecen activamente durante el verano, pero que no llegan a florecer, las hojas de estas primocañas son compuestas, contando con 5 folíolos generalmente.

Floricañas: Son las primocañas que después de pasar cierto periodo de dormancia, florecen y fructifican, estas cañas no aumentan en longitud, más bien producen brotes laterales, que generalmente terminan en inflorescencia. Siendo por lo regular las hojas más pequeñas en comparación con las de las primocañas, y por lo general presentando 3 folíolos.

#### **a. Raiz**

Producen raíces abundantes, racimosas, nudosas profundas, la mayoría de ellas llegan a alcanzar 35 cm algunas llegan hasta un metro de longitud (Ospina & Aldana, 1998).

#### **b. Hojas**

Las hojas son compuestas, estipuladas, pecioladas y con el margen de la lámina dentado. El número de folíolos, en las hojas turionales, varía entre 3-5(-7) y, aunque todas las especies tienen tendencia a presentar como más frecuente un número concreto de folíolos, para una misma especie pueden ser igualmente características hojas con 3, 4 ó 5 folíolos. Las hojas pentafolioladas son palmaticompuestas y a su vez pueden ser digitadas o pedatas. En la inflorescencia normalmente las hojas son simples en la parte superior y con 2-3(-5) folíolos en la inferior. Tanto en el haz como en el envés pueden aparecer pelos: simples en el haz

y simples y estrellados en el envés.

La forma de la lámina del folíolo terminal, es una característica taxonómica importante y se mantiene más o menos constante dentro de una misma especie. La punta puede ser mucronada o subulada y la base cuneiforme, redondeada, truncada o cordada. Las estípulas son concrecentes con el tallo o con el peciolo y varían en su forma: lanceolada, linear-lanceolada, y filamentosa (Monasterio-Huelin & Macía, 1992).

### **c. Inflorescencia**

La inflorescencia en el género *Rubus* es compuesta y de tipo panícula no siendo constante ni el tamaño ni el número de flores dentro de una misma especie. En función de que los pedúnculos sean más o menos largos, la panícula puede ser: ancha por arriba con los pedúnculos superiores largos (piramidal truncada), estrecha por arriba y más ancha por abajo (piramidal) o, con todos los pedúnculos más o menos de la misma longitud (cilíndrica). No es raro que, cuando las ramas superiores tengan los frutos ya desarrollados o por algún motivo hayan sido mutiladas, se desarrollen ramas laterales desde la axila de las hojas inferiores de la inflorescencia.

Casi todas las especies tienen glándulas sentadas sobre el eje, pedúnculos y pedicelos que, en caso de que la pilosidad sea abundante, quedan escondidas entre los pelos. (Monasterio-Huelin & Macía, 1992).

### **d. Flor**

Heteroclamídea y hermafrodita. El cáliz está formado por 5 piezas imbricadas, dialisépalas y persistentes; los sépalos son enteros, de forma lanceolada, y acabados en una punta que a veces se prolonga en un acumen más o menos largo. El color de los pétalos varía entre blanco y rosa-rojo y suele ser constante para cada especie. Aunque lo normal son las corolas pentámeras, el número de piezas puede ser mayor de 5 o incluso presentar corola doble. La forma de los pétalos (transovada, oval o suborbicular) y su tamaño son valores más o menos constantes para cada especie. Las anteras son glabras en la mayoría de las especies, pero también las hay pilosas. El gineceo es pluricarpelar y apocárpico. De cada ovario surge un estilo subterminal rematado en un estigma capitado. El ovario puede ser glabro o peloso

y, en este caso, los pelos se sitúan preferentemente en la parte apical (Monasterio-Huelin & Macía, 1992).

#### **e. Fruto**

El fruto es una pluridrupa con las drupeolas algo concrecentes en la base, pero sin llegar a ser totalmente sincárpico. El número y tamaño de las drupeolas es variable (Monasterio-Huelin & Macía, 1992). Son frutos elipsoidales de 1.5 a 2.5 cm de largo, verdes al formarse posteriormente rojos y color morado a negro al madurar (Ospina & Aldana, 1998).

### **2.5. Cultivo y Producción**

En condiciones naturales la zarzamora desarrolla en lugares frescos y fríos; hasta la fecha el cultivo se ha limitado a lugares con inviernos definidos; no obstante, cuando las temperaturas invernales bajan de -17 a -23 °C la mayoría de los cultivares sufren daño. Por otro lado, en climas con inviernos más calientes muchos cultivares no crecen bien (Moore, 1994).

Rodríguez (1993) demostró que los cultivares de zarzamora que se explotan en México tienen un buen comportamiento en áreas deficientes en acumulación de frío, por lo que los ha definido como cultivares exigentes de calor. También demostró que algunos cultivares de zarzamora no tienen requerimientos de frío (Rodríguez, 1989).

La zarzamora se adapta a diversidad de suelos, de preferencia los que tengan buen drenaje y pH entre 5.5 y 6.5 (Crocker & Sherman, 1998 y Moore, 1994); para su mejor desarrollo es conveniente que la profundidad del suelo sea mayor de 50 cm.

### **2.6. Variedades**

Las variedades cultivadas de zarzamora son de origen complejo, pero la mayoría son especies o híbridos derivados de dos o más especies nativas de Norteamérica y de Europa del género (Ibarra *et al.*, 2013), sin embargo, con la finalidad de evitar la confusión entre las distintas especies, los taxónomos han acordado que el nombre científico de las

variedades comerciales se designe simplemente como *Rubus sp.* o *Rubus* subgénero *Eubatus* (López, 2009).

El programa del USDA-AR en Corvallis, comenzó en 1928 y fue conducido en cooperación con la universidad de Óregon, este programa de cruce de zarzamora continuamente activo es el más antiguo en el mundo.

Al suceder G.F. Waldo a Darrow en 1932. Waldo generó una serie de cruces utilizando principalmente ‘Loganberry’, ‘Youngberry’, ‘Mammoth’, ‘Himalaya’ y especies silvestres como *R. ursinus* (es decir, ‘Zielinski’), incluyendo cultivares de floración perfecta (es decir, ‘Satiam’/ ‘Ideal’), donde el parental materno fuese *R. ursinus* y el parental paterno desconocido, pero se sospechaba que era ‘Loganberry’ (Waldo, 1968). Este germoplasma generó rápidamente las versiones ‘Pacific’ (Waldo & Wiegand, 1942), ‘Cascade’ (Waldo & Wiegand, 1942), ‘Chehalem’ (Waldo, 1948) y ‘Olallie’ (Waldo, 1950). La siguiente generación de cruces produjo ‘Marion’ (Waldo, 1957). A finales de los años sesenta, Francis J. ‘Whitey’ Lawrence se hizo cargo del programa de Waldo. Evaluó algunos de los materiales que Waldo comenzó, es decir, ‘Kotata’ (Lawrence, 1986), pero lo más importante, desarrolló selecciones excepcionales sin espinas de ‘Austin Thornless’. Finalmente, ‘Waldo’ fue lanzado como la primera zarzamora negra sin espinas (Lawrence, 1989). El germoplasma que desarrolló proporcionó los bloques de construcción a partir de los cuales se desarrollaron estos nuevos cultivares. A partir de principios de los noventa, el objetivo impulsado por la industria para un cultivar "sin espinas", resistente al frío y firme con el sabor que ‘Marion’, se hizo mucho más urgente a medida que aumentaban los costos legales debido a la contaminación espinosa.

## **2.7. Cultivar “Marionberry”**

‘Marion’, es un hexaploide, producido en 1956 por el “Cooperative breeding program of the U.S. Department of Agriculture-Agricultural Research Service y el “Oregon Agricultural Experiment Station”. El nombre ‘Marion’ fue elegido en referencia al condado de Marion, Estado de Óregon donde la baya fue probada exhaustivamente. En 1948, ‘Marion’ fue seleccionada por Waldo a partir del cruce de ‘Chehalem’ y ‘Olallie’ realizada en 1945.

Su genealogía es bastante compleja. Contiene 44 por ciento de *Rubus ursinus*, el 25 por ciento de *R. armeniacus* (el ‘Himalaya’, una maleza introducida de Europa a finales de 1800) y el 6 por ciento de *R. idaeus* (frambuesa roja).

Dos de los mayores problemas de producción para ‘Marion’ son el bajo porcentaje de brotación y la pobre resistencia al frío. La escases de brotes pueden ser resultado de diversos factores incluyendo lesiones por frío, enfermedades, baja exposición de luz, y la competencia por nutrientes.

El sistema más común para los berries (zarzamoras y frambuesas) es la producción anual o cada año (EY), donde las cañas vegetativas reproductivas crecen simultáneamente en el mismo lugar. El otro sistema usado comercialmente para ‘Marion’ es la producción bienal o año alternante (AY), donde hay una completa separación de las fases vegetativas y reproductivas.

## **2.8. Características botánicas**

El fruto tiene un peso aproximado de 4.5-5.5 gramos, cuenta con cerca de 65-80 drupas por fruta en temporada temprana y 60-70 en temporadas posteriores (Waldo, 1950, Lawrence, 1986, Thompson, 1995<sup>a</sup> y Finn *et al.*, 1997).

Los pirenos- nombre que hace alusión al hueso de las drupas- están cubiertos con un material gelatinoso, de manera que genera un efecto amortiguador en el momento que se come la fruta. (Finn *et al.* 1997)

## **2.9. Zonas de crecimiento**

Establecimiento de plántulas *in vitro* - Explante

Los factores que influyen sobre la calidad del explante son: el tipo de órgano que sirve como explante, la edad ontogénica y fisiológica del mismo, la estación en la cual se colecta el material vegetal, el tamaño y el estado sanitario general de la planta donante.

La planta donante debe elegirse en base a una selección masal positiva para las características agronómicas deseables. Una vez seleccionados los individuos, es preciso

definir el tipo de explante a establecer en condiciones *in vitro*. En general, los órganos jóvenes o bien rejuvenecidos son los que tienen mejor respuesta en el establecimiento que los obtenidos a partir de materiales adultos. El empleo de explantes que se encuentran expuestos a bajos niveles de patógenos puede resolver el problema de la contaminación por hongos y bacterias durante el establecimiento del cultivo *in vitro* (Levitus *et al.*, 2004).

## **2.10. Medios de cultivo**

El éxito del cultivo *in vitro* es altamente influenciado por la naturaleza del medio de cultivo usado. Para un crecimiento sano y vigoroso, las plántulas necesitan tomar del medio, iones inorgánicos (macro y micronutrientes), carbohidratos (usualmente sacarosa), vitaminas, aminoácidos y fitohormonas (Geroge & Sherrington, 1984).

Los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento como auxinas, citoquininas y ácido giberélico y las condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantes. (Levitus *et al.*, 2004)

### **2.10.1. Macro y Micronutrientes**

Los macroelementos indispensables son nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio y magnesio, los cuales intervienen en la conservación de los equilibrios iónicos de las plantas (Margara, 1988).

Los microelementos son esenciales en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas. Los principales son: hierro, cobre, zinc, manganeso, molibdeno, boro y cloro (Roca & Mroginski, 1991).

La adición de hierro conjuntamente con un agente quelante ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) lo hace disponible en un amplio rango de pH (Roca & Mroginski, 1991).

### **2.10.2. Vitaminas y Aminoácidos**

Estas sustancias son efectivas en pequeñas cantidades y actúan como factores de la división celular o del crecimiento, ya que ambos cesan cuando algún compuesto escasea en el tejido de la raíz (Margara, 1988).

Según Seemann (1993), de las vitaminas, la única que ha probado ser un componente esencial de varios medios de cultivo es la tiamina (Vit.B1).

Además de vitaminas, se han incorporado aminoácidos a los medios de cultivo, siendo la glicina la que más se usa en la preparación de los medios de cultivo (Roca & Mroginski, 1991).

### **2.10.3. Reguladores de crecimiento**

El crecimiento en las plantas es un proceso dinámico, complejo y rigurosamente controlado. Los reguladores del crecimiento vegetal juegan un papel principal en el control del crecimiento, no únicamente dentro de la planta como universo, sino también a nivel de órgano, tejido y célula (Wareing & Phillips, 1973).

Meyer (1976), señala que es común considerar como regulador orgánico a compuestos no nutrientes, exógenos o endógenos que en pequeñas cantidades promueven, inhiben o modifican procesos fisiológicos, reservando el término “hormona” a los reguladores producidos por el vegetal.

Las hormonas más críticas que permiten mayores variaciones en los medios nutritivos son auxinas y citoquininas (Hartmann & Kester, 2002).

De acuerdo a Skoog & Miller (1957) citado por Murashige (1974), la iniciación de raíces y brotes en las plantas, se encuentra regulada básicamente por la interacción entre auxinas y citoquininas.

La relación auxina- citoquinina menor favorece la brotación, mientras que si es mayor a uno se induce el enraizamiento de los explantes (Murashige, 1974).

#### **a. Auxinas**

En cultivos de tejidos, las auxinas se han utilizado para inducir la división celular y la citodiferenciación. En general, las auxinas en bajas concentraciones favorecen el enraizamiento, mientras que en altas concentraciones induce la formación de callos (Bhojwani & Dantu, 2013).

En la presente investigación se hará uso del ácido naftalenacético (ANA, siglas en español) y Acido Indol Butílico (IBA, sus siglas en inglés).

#### **b. Citoquininas**

La incorporación de estos compuestos en medios de cultivo es principalmente para activar la división celular, y para inducir la diferenciación de brotes adventicios en callos y órganos, y la proliferación de brotes de las yemas axilares al reprimir la dominancia apical (Bhojwani & Dantu, 2013).

En la presente investigación se hará uso de Bencilaminopurina (BAP, siglas en español).

#### **c. Giberelinas**

Son reconocidas como biorreguladores esenciales en la organización de tejidos, reprimiendo los procesos de formación de callos y la iniciación de órganos en algunos casos (Murashige, 1974).

El efecto mejor conocido de las giberelinas, que fue primero observado, es el alargamiento del tallo y de las hojas en un cierto número de especies vegetales superiores (Meyer, 1976).

### **2.11. Cultivo *in vitro* de micro-estacas**

El cultivo *in vitro* de plantas es una técnica dentro de la biotecnología vegetal, que consiste en cultivar y manipular las plantas en condiciones controladas como la temperatura, intensidad y duración de luz, nutrición, textura y pH del medio; a partir del cultivo de protoplastos, células aisladas, callo, embriones, órganos y tejidos; hasta el cultivo de plantas completas. Se puede utilizar para la producción de metabolitos vegetales secundarios de interés farmacéutico o de uso en la industria de alimentos, así como en diversas investigaciones (Augé *et al.*, 1986 y Pierik, 1990).

Esta técnica teóricamente permite obtener una propagación masiva de plantas libres de enfermedades haciendo uso en algunos casos desde una célula (micropropagación), y se basa en la teoría de la totipotencialidad elaborada por Schwann y Schleiden en 1838- 1839 (Gautheret, 1982).

El cultivo *in vitro* es de gran interés por su aplicación en la obtención rápida de especies para reforestación, rescate de especies amenazadas, y conservación *in vitro* de germoplasma valioso. La propagación *in vitro* tiene la particularidad de poder obtener plantas genética y fisiológicamente similares a las plantas madre que fueron seleccionadas por sus características superiores o de interés, además en grandes cantidades en tiempos y espacios reducidos (Pérez *et al.*, 2008).

Las técnicas de cultivo de tejidos también pueden ser utilizadas para obtener híbridos entre especies incompatibles a través de las técnicas de cultivo de embriones, cultivo de óvulo, o la hibridación somática (Torres, 1988). De manera que el cultivo aséptico se ha convertido en un procedimiento ampliamente utilizado y de rutina para el "rescate" de los embriones que no crecen ni se convierten en plántulas. En un sentido estricto, el material no se multiplica clonalmente, pero si se está multiplicando el germoplasma que, de otra forma, se perdería (Krikorian, 1991).

El término de propagación *in vitro* o micropropagación se utiliza para referirse al establecimiento, multiplicación y posterior enraizamiento *in vitro* de brotes (Capuana & Giannini, 1997 y Bon *et al.*, 1998).

#### **2.11.1. Etapas del cultivo de estacas *in vitro***

La primera propuesta realizada para sistematizar el diseño de los protocolos de micropropagación se debió al Dr. Murashige e inicialmente contemplaba las etapas I, II y III (George, 2008). Posteriormente se aceptó la sugerencia realizada por Maene y Debergh (George, 2008) de añadir una etapa previa, a la que se denominó Etapa 0 porque incluía actuaciones a tener en cuenta antes de abordar la Etapa I. Más recientemente se incluyó una etapa final, la etapa IV, correspondiente a la transferencia de la planta a condiciones ambientales "naturales" (Cano, 2013).

A continuación, se describirá cada etapa.

**a. Etapa 0: Etapa Preparativa**

Se trata de una fase introducida por Debergh & Maene (1981) en la que el material vegetal es tratado previamente a la etapa de establecimiento con el fin de mejorar los resultados de dicha etapa y hacerla además reproducible. El material vegetal se somete a una selección y a una serie de tratamientos para mejorar su estado sanitario: cultivo bajo condiciones controladas de temperatura y humedad, eliminación de patógenos, etc. (Santana, 2015).

La correcta elección y preparación del explante incide directamente sobre la calidad del mismo y su respuesta frente a los dos principales problemas que afectan al establecimiento del cultivo, que son la contaminación con microorganismos y la oxidación del explante. (Levitus *et al.*, 2004)

**b. Etapa I: Etapa de establecimiento del explante**

En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes (Levitus *et al.*, 2004).

El principal objetivo de la etapa uno es obtener un gran porcentaje de explantes libres de patógenos; esto se logra sometiendo al tejido a un lavado con agua corriente, seguido por la esterilización con uno o más desinfectantes a concentraciones apropiadas y en tiempos determinados según la especie (Torres, 1988).

**c. Etapa II: Multiplicación y Elongación de brotes**

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos (subcultivos) y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento, bulbificación, etc.) (Levitus *et al.*, 2004).

Este incremento puede ser realizado por varios procedimientos alternativos, ya sea por el desarrollo de yemas axilares y terminales, también por la inducción de brotes adventicios o a través de emhriogénesis somática (Murashige, 1974, Evans *et al.*, 1981, Hartmann & Kester, 1987, Torres, 1988 y Sagawa & Kunisaki, 1990).

**d. Etapa II: Enraizamiento *in vitro***

Para Murashige (1974) ésta es la última etapa, en la cual el objetivo final es preparar el propágulo para su sucesiva transferencia al suelo. En algunas especies, para inducir enraizamiento se requiere transferir los brotes a un medio libre de citoquininas. Así mismo, en muchas especies la iniciación de raíces ocurre solamente en la presencia de auxina.

**e. Etapa IV: Aclimatación del material obtenido *in vitro***

La aclimatación de especies cultivadas asépticamente *in vitro*, Bratnerd y Fuchigami citados por Torres (1988) la han definido como un proceso por el cual un organismo se adapta a un cambio ambiental. La aclimatación es necesaria porque las plántulas derivadas *in vitro* no están adaptadas ni establecidas en condiciones *in vivo*. Las plantas logran aclimatarse reduciendo gradualmente la humedad relativa en su ambiente; esto puede lograrse simplemente reduciendo la cantidad de vapor de agua recibida o haciendo cortes en la bolsa plástica o destapando gradualmente las cajas o macetas en que están contenidas las plántulas.

### **III. METODOLOGÍA**

El presente trabajo de investigación se realizó en el Centro de Investigación de Recursos Genéticos, Biotecnología y Bioseguridad (CIRGEBB) de la UNALM.

El material vegetal fue obtenido en el Departamento de Lima, Distrito de Puente Piedra, Km 36 ½, Asociación de Productores Valle Hermoso, Zapallal, parcela del Sr. Renzo Moreno.

A partir de la experiencia del Sr. Moreno respecto a la obtención del material de zarzamora o mora híbrida, ‘Marionberry’, esta es su afirmación: “Mi vocación frustrada de agricultor por mi origen provinciano, me llevó a construir en el mundo urbano donde radico (Lima) un lugar parecido a la vida del campo en Zapallal, donde tengo plantas de origen andino, costeño, selváticas y algunas exóticas, la mora híbrida (‘Marionberry’) lo conseguí a través de un aviso donde ofrecían plantones de frambuesa, le compré a un ciudadano norteamericano, 5 plantones de supuestamente frambuesa hace ocho años aproximadamente, comencé a investigar y me di con la sorpresa que no eran frambuesas si no otra variedad de zarzamora. Aprendí a cultivarla, reproducirla y hoy sé que muchas variedades de plantas ingresan al país de forma informal.”

#### **3.1. Materiales**

##### **3.1.1. Medios de cultivo**

Los medios de cultivo fueron elaborados a partir de los componentes y concentraciones de macronutrientes y micronutrientes de Murashige y Skoog (1992) y medio Lloyd y McCown (1981) conocido como medio Woody Plant (WP). Suplementados con solución de EDTA de hierro y sodio (NaFeEDTA), y mio-inositol y sucrosa, en concentraciones de 100 mg/L y 30 gr/L respectivamente. El componente gelificante, para obtener medios sólidos, fue el agar marca DIFCO a la concentración de 6.5 gr/L. El pH de todos los medios fue ajustado a 5.6.

### **3.1.2. Material vegetal**

El material vegetal fue obtenido en el Distrito de Puente Piedra, en la parcela del Sr. Renzo Moreno. Las plantas (*Rubus* L. Subg. *Eubatus* (Focke) Focke) provenían de la propagación de una planta madre y fueron compradas en bolsas negras con un sustrato elaborado por el mismo dueño de la parcela. Las plantas estuvieron en el centro experimental del CIRGEBB en la Universidad Nacional Agraria La Molina, hasta alcanzar un tamaño apropiado para después extraer de ellas estacas con 5-9 brotes axilares que fueron utilizadas para los experimentos de introducción del material a condiciones *in vitro*.

### **3.1.3. Hormonas vegetales**

Los fitoreguladores utilizados fueron: auxinas (ANA) Ácido Naftalenacetico, (IBA) Ácido indol butirico), citoquinina (BAP), Bencilaminopurina y giberelinas (AG3), Ácido giberélico 3).

### **3.1.4. Sustancias desinfectantes**

Entre las sustancias que se utilizaron para la etapa de desinfección del material vegetal, estuvieron:

Jabón carbónico, alcohol de 70 por ciento, hipoclorito de sodio al 4 por ciento y tween 20.

### **3.1.5. Instrumentos, materiales y equipos de laboratorio**

Se usaron instrumentos, tales como: probetas, pipetas, beakers, placas Petri, pinzas de metal, bisturí, frascos de 250 ml y micropipetas. Materiales: papel aluminio, papel bond, pabilo, stretch film, papel toalla, y plumones indelebles. Equipos: pH-metro, agitadores magnéticos, balanza analítica, balanza electrónica, cámara de flujo laminar, horno microondas, autoclave, estufa y refrigerador.

## **3.2. Metodología**

### **3.2.1. Colección del material vegetal**

La investigación se realizó en el Centro de Investigación de Recursos Genéticos, Biotecnología y Bioseguridad (CIRGEBB) de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Se tomaron yemas axilares, 9 yemas a partir de una estaca joven de 30 cm de longitud extraídas de planas ubicadas en el Campo Experimental del CIRGEBB.

### **3.2.2. Preparación de medios de cultivo**

Se prepararon los medios de cultivo correspondientes para las etapas de establecimiento y multiplicación. Para cada etapa fue necesaria la preparación de 250 ml de medio que son equivalentes a seis (6) frascos, es decir 6 repeticiones por tratamiento.

Los medios de cultivo fueron preparados de la siguiente manera:

1. Colocar los componentes líquidos (formulación propia del laboratorio), que comprenden a los macro y micro constituyentes, (correspondientes a los medios MS y WP), en un beaker sobre un agitador magnético.
2. Después se añadieron los reactivos sólidos tales como mio-inositol y sucrosa.
3. Luego de que la sucrosa se disuelve por completo, el contenido debe ser enrasado en una probeta.
4. Ajustar el pH a 5.6 haciendo uso de hidróxido de sodio 1N y ácido clorhídrico 1N.
5. Por último agregar el agar y licuar haciendo uso de horno microwaves, luego dispensar en frascos de 250 ml de capacidad a razón de 15 ml por frasco.
6. Autoclavar los frascos a 15 lb de presión, durante 20 minutos a 121 °C.

### **3.2.3. Fase de desinfección**

Las estacas fueron seccionadas en porciones de aproximadamente 5 cm de largo, conteniendo 3 yemas aproximadamente, ello para facilitar el inicio de la fase de desinfección. El protocolo de desinfección se inicia con el cepillado de la estructura vegetal con jabón carbólico, luego sumergir las estacas en jabón carbólico y agitar durante 5 minutos. Posteriormente se sumergió en alcohol de 70° durante 3 segundos, luego sumergir en una solución 2 por ciento hipoclorito de sodio con 3 gotas de Tween 20 durante 20 min. Por último, se enjuagó 3 veces con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar.

### **3.2.4. Fase de establecimiento**

La fase de establecimiento conlleva el estudio de la formulación del medio de cultivo más efectivo para un óptimo desarrollo del explante. En el estudio, se probaron cuatro tratamientos: 3 medios de cultivo basales y uno suplementado con la hormona Ácido Naftalen Acético (ANA): MS, MS ½, WP y WP + 0.05 ANA, como se indica en la tabla 4.

El medio Murashige y Skoog (MS) fue preparado al 1X, es decir 100 por ciento de los componentes de micronutrientes, macronutrientes y constituyentes orgánicos suplementado con 2 por ciento de sacarosa, 100 mg.L-1 de mio-inositol y 0.7 por ciento de agar y a pH ajustado a  $5.6 \pm 0.1$ . El medio MS ½ contiene el 50 por ciento de cada uno de los componentes del medio MS El medio Woody Plant 1X (WP) contiene el 100 por ciento de los compuestos de micronutrientes, macronutrientes y constituyentes orgánicos suplementado con 3 por ciento de sacarosa, 100 mg.L-1 de mio-inositol y 0.7 por ciento de agar a pH ajustado a  $5.6 \pm 0.1$ . Los medios de cultivo se esterilizaron en el autoclave a 15 lb de presión, durante 20 minutos a 121 °C Una vez que se desarrolló el proceso de desinfección, se sembraron las yemas en los diferentes medios o tratamientos, cada frasco con dos yemas y cada tratamiento con 6 repeticiones o sea seis frascos.

**Tabla 4: Medios de establecimiento**

Medio de cultivo		Hormona
1	MS	-
2	MS ½	-
3	WP	-
4	WP+0,05 ANA	0.05ANA

Nota: Se muestran los tipos de medio de cultivo usados en la etapa de establecimiento.

### 3.2.5. Fase de Micropropagación

La hormona seleccionada como también su concentración fue elegida de diferentes bibliografías referidas a la micropropagación *in vitro* de zarzamora (*Rubus sp.*) silvestre, ‘Marionberry’ y de protocolos referidos al género *Rubus* que abarca frambuesas y en base a la experiencia adquirida por el CIRGEBB en trabajos previos de investigación.

En esta fase se evaluó el efecto simple y combinado de una citoquinina, dos auxinas y una giberelinas, siendo éstas: Bencilaminopurina (BAP), Ácido Naftalenacético (ANA), Ácido Indol Butírico (IBA) y Ácido giberélico (GA3) a las concentraciones anotadas en la Tabla 5.

Se sembraron dos yemas (microestacas) en cada frasco, estableciéndose seis repeticiones por tratamiento. Las evaluaciones fueron hechas a los 45, 90 y 120 días de sembrados los explantes.

**Tabla 5: Tratamientos**

Medios de cultivo basal WP	BAP (ppm)	ANA (ppm)	IBA (ppm)	GA3 (ppm)
T1	-	0.75	-	-
T2	-	-	0.5	-
T3	-	-	-	1.0
T4	1.0	-	-	0.5
T5	-	0.75	-	1.0
T6	-	-	0.5	1.0
T7	2.0	0.1	-	0.2
T8	1.0	-	0.1	0.1
Control	-	-	-	-
T10	-	-	2.0	-

Nota: Tratamientos o medios de cultivo estudiados para establecer el medio de propagación de zarzamora, cultivar 'Marionberry'.

### 3.3. Estadística

#### 3.3.1. Variables de evaluación

Para la investigación, se planteó un diseño completamente al azar, debido a que el experimento se realizó en laboratorio, es decir las condiciones se consideraron homogéneas. Cada frasco fue considerado como una unidad experimental, para la fase de establecimiento abarca 24 unidades experimentales, con 4 tratamientos, incluyendo el control, para la fase de multiplicación se consideran 48 unidades experimentales, con 8 tratamientos y un control. Las observaciones se realizaron en tres tiempos 45, 90 y 120 días.

#### 3.3.2. Variables respuesta

Para una mejor apreciación y estandarización de las variables consideradas se decidió establecer algunos parámetros en cada etapa.

##### a. Etapa de desinfección

Se utilizó el protocolo previamente establecido por el I laboratorio CIRGEBB y que dan excelentes resultados en la introducción de material vegetal a condiciones *in vitro*. Es decir supera al 80 por ciento de desinfección de los explantes.

**b. Etapa de establecimiento y etapa de multiplicación**

- Número de brotes: Se considera brote a aquellas yemas axilares que surgen del tallo.
- Número de raíces: Son consideradas las raíces principales y no las ramificadas o adventicias.
- Conteo de hojas: Se consideró a las hojas verdes grandes, medianas y pequeñas, no las amarillentas o marchitas.
- Longitud de tallo: Las mediciones fueron aproximadas, medidas con regla, donde la línea de referencia inferior fue la superficie del medio hasta la última yema axilar, sin considerar las últimas hojas. La máxima medida registrada fue de 9.2 cm, tamaño del frasco.

**c. Etapa de enraizamiento**

En esta etapa se consideró la presencia o ausencia de raíces registradas en la etapa de multiplicación, ya que el uso de las hormonas en dicha etapa promovió el crecimiento de raíces. A partir de la observación de los resultados de la etapa de multiplicación se llegará a una conclusión de qué medio suplementado con hormonas es el más óptimo para la generación de raíces para una posterior salida a invernadero.

**3.3.3. Diseño Experimental**

El análisis se estratificó según las etapas de cultivo de tejidos: establecimiento y multiplicación.

Se utilizó la prueba de ANOVA para comparar cada una de las variables entre los diferentes tratamientos según cada etapa.

Además para cada etapa se utilizó el diseño de bloques completamente al azar con arreglo factorial, la ecuación se muestra a continuación:

Ecuación:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

Donde:

- $Y_{ij}$  Variable respuesta (Longitud de tallo, número de hojas vivas y muertas, número de raíces)
- $\mu$  Media general
- $\alpha_i$  Efecto del j-ésimo tratamiento (Medio de cultivo)
- $\beta_j$  Efecto de la i-ésima repetición, días de evaluación (Bloque)
- $\epsilon_{ij}$  error aleatorio

El modelo aditivo lineal para las dos etapas del protocolo.

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

ELEMENTO	ESTABLECIMIENTO	MULTIPLICACIÓN
$Y_{ijk}$	Valor de la variable, empleando el i-ésimo medio de cultivo durante el j-ésimo día de evaluación para la k-ésima repetición.	Valor de la variable, empleando el i-ésimo medio de cultivo durante el j-ésimo día de evaluación para la k-ésima repetición.
$\mu$	Media general de la respuesta	
$\alpha_i$	Efecto de la i-ésima días de evaluación, siendo $i=1,2,3$	
$\beta_j$	Efecto del j-ésimo medio de cultivo, siendo $j=1,2,3,4$	Efecto del j-ésimo medio de cultivo, siendo $j=1,2,3,4,5,6,7,8$
$(\alpha\beta)_{ij}$	Efecto de la i-ésima días de evaluación sobre el j-ésimo medio de cultivo.	
$\epsilon_{ijk}$	Efecto del error aleatorio para el i-ésimo día de evaluación empleando el j-ésimo medio de cultivo de establecimiento para la k-ésima repetición.	Efecto del error aleatorio para el i-ésimo día de evaluación empleando el j-ésimo medio de cultivo de contaminación para la k-ésima repetición.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Resultados

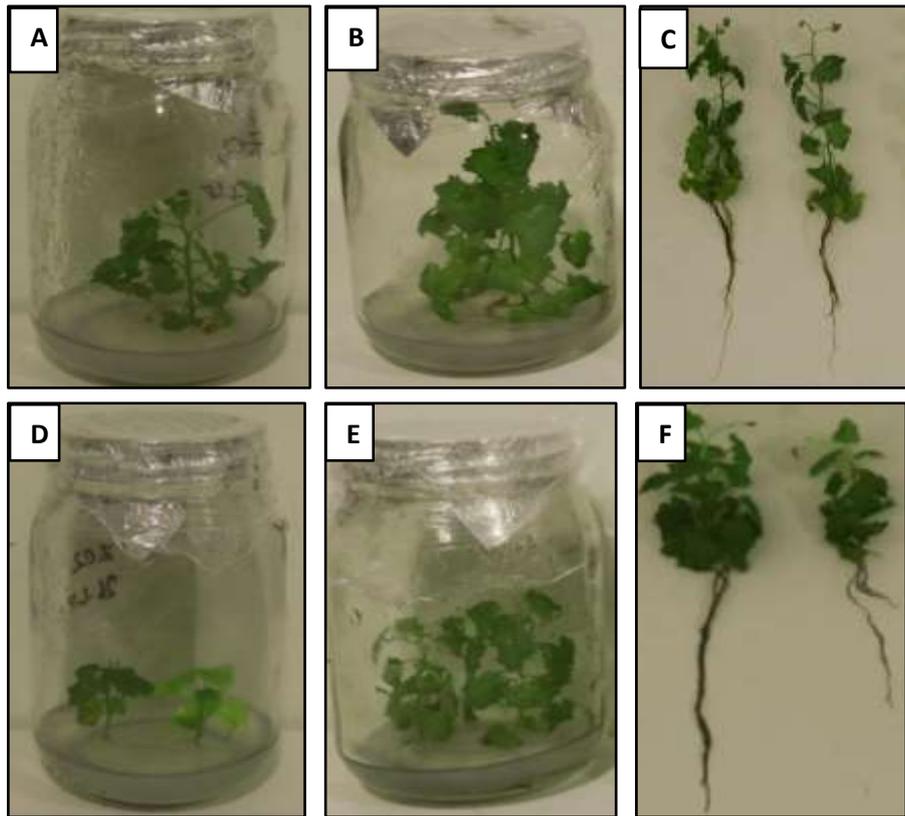
#### 4.1.1. Establecimiento

La etapa de introducción fue superada al encontrar el protocolo de desinfección para las estacas de zarzamora, tanto el uso de soluciones como el jabón carbónico, alcohol al 70 por ciento e hipoclorito de sodio permitieron obtener plantas libres de patógenos externos, a su vez éstas fueron sembradas en los medios sugeridos para la etapa de establecimiento.

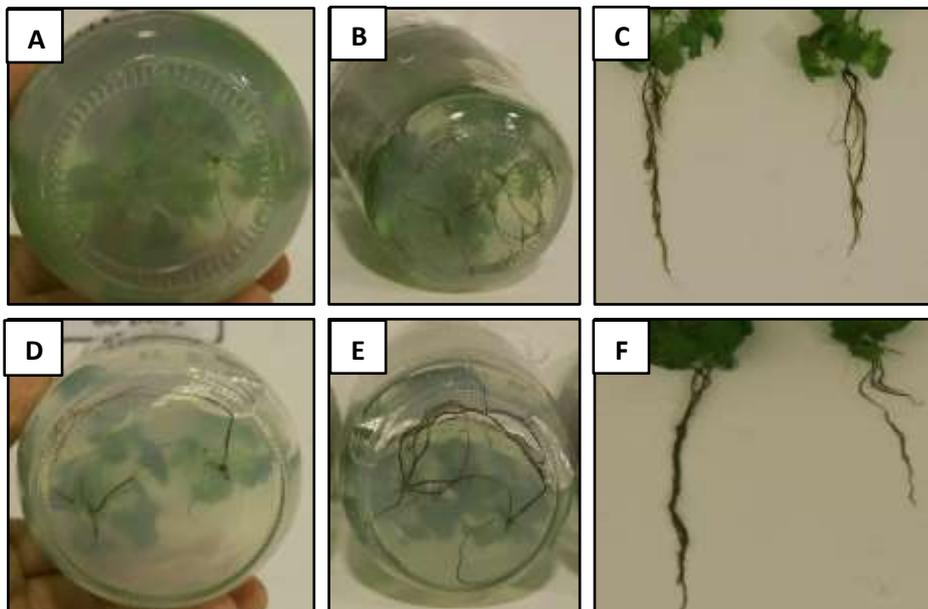
En la etapa de establecimiento se procedió a seleccionar el medio de cultivo en el cual las yemas progresaran, el cual normalmente es MS, sin embargo se realizaron pruebas con este medio a mitad de concentración e igualmente se probó el medio basal WP que según algunas referencias es recomendable para plantas de este género, *Rubus*.

Los aspectos que se tomaron en cuenta fueron la longitud de tallo, número de hojas y por lo tanto el número de brotes y formación de raíces. Las variables ya mencionadas sirvieron para poder establecer el medio basal con la mejor respuesta, siendo WP el medio que permitió obtener plantas con aspecto más vivaz, como hojas verdes, limbos amplios, también se observaron tallos fuertes y verdes. Igualmente se observó la formación de mayor número de raíces.

En la Figura 1 se muestra el desarrollo de los tallos y hojas de las plantas en el medio WP en 45, 90 y 120 días. Se muestra a su vez la comparación con MS.



**Figura 1:** Plántulas de zarzamora, cultivar Maryonberrie: fase de establecimiento. A: WP a 45 días; B: WP a 90 días; C: WP a 120 días; D: MS a 45 días; E: MS a 90 días; F: MS a 120 días.



**Figura 2:** Raíces en fase establecimiento A: WP a 45 días; B: WP a 90 días; C: WP a 120 días; D: MS a 45 días; E: MS a 90 días; F: MS a 120 días.

#### **4.1.2. Micropropagación**

Después de establecerse que el medio basal WP es el más apropiado, se procedió a la etapa de multiplicación a fin de evaluar el mejor tratamiento que permitiera la multiplicación *in vitro* del cultivar.

La etapa de multiplicación permitió mejorar el medio de cultivo basal, para obtener mayor cantidad de brotes con una calidad óptima ya sean tallos fuertes y raíces abundantes.

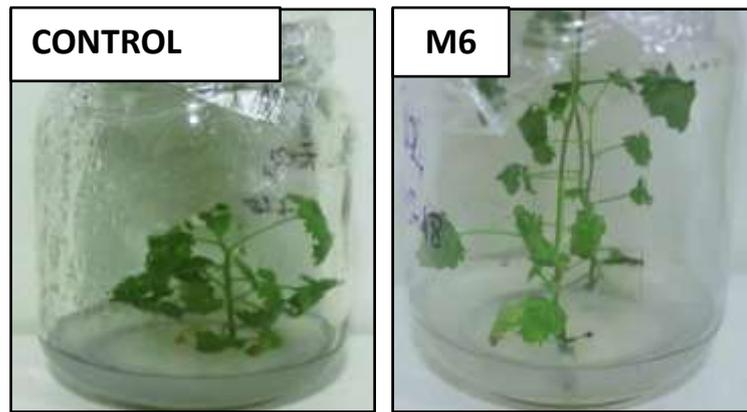
Se analizaron 9 tratamientos y un control, tratamientos que diferían en el tipo y concentración de hormonas vegetales suplementadas al medio basal WP. Se analizaron las respuestas evaluando las variables: longitud de tallo, número de brotes, número de hojas vivas y número de raíces.

##### **a. Longitud de tallo**

En las Tablas 16 y 17, del Anexo 2 se muestran los gráficos de barras y valores de promedios y otros datos.

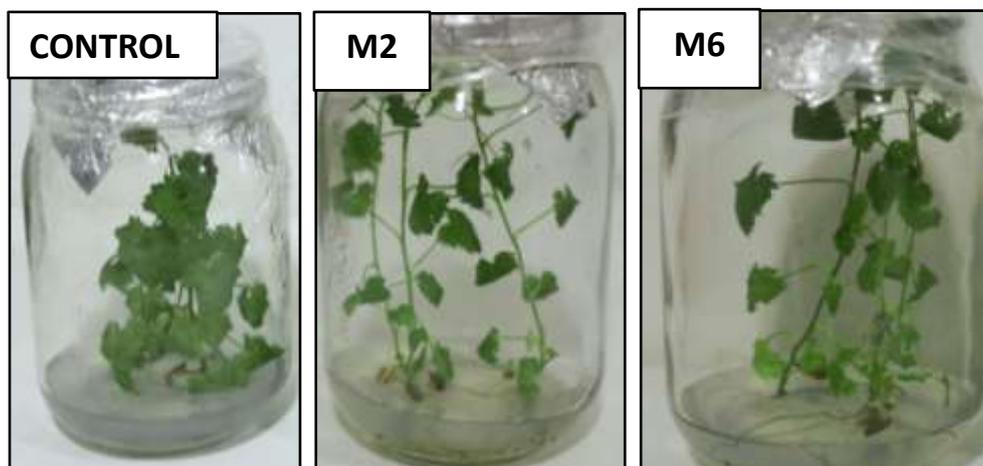
A los 45 días se observó una mayor longitud de tallo en el medio de cultivo T6 (IBA 0.5+GA 3 1.0) con un promedio de 5.492 cm.

En la Figura 3 se muestra el tratamiento 6 y el control, se observó que a pesar el medio T6 obtuvo tallos más largos estos eran muy delgados a diferencia del control y poseía entrenudos largos a comparación de las plantas sembradas en los medios T5, T2 y T3 cuyos entrenudos eran un tanto más cortos pero no tanto como los del control y T1. T7 y T8 mostraron tallos con entrenudos muy cortos en comparación con el control.



**Figura 3: Longitud de tallo a los 45 días: Control (WP); T6 (IBA 0.5+GA 3 1.0). A los 45 días.**

A los 90 días de sembradas las plántulas se observó una mayor longitud de tallo en el medio de cultivo T6 (IBA 0.5+GA3 1.0) con un promedio de 8.392 cm, como se muestra en las Figura 4.



**Figura 4: Longitud de tallo a los 90 días Control (WPM); T2 (IBA 0.5 ppm); T6 (IBA 0.5+GA 3 1.0).**

A los 120 días de sembrados los explantes se observó una mayor longitud de tallo en el medio de cultivo T2 (IBA 0.5 ppm) y T5 (ANA 0.75+GA3 1.0) con un promedio de 9.2 cm.

El análisis estadístico utilizando la prueba de ANOVA demostró que la longitud de tallo es diferente entre cada uno de los medios ( $p=0.05$ ), en los días de evaluación (45, 90 y 120). (Ver Tabla 18 del Anexo 2).

La comparación de la longitud de tallo entre los diferentes tratamientos se realizó utilizando el método de comparación múltiple Sidak-Bonferroni. De acuerdo a este método se obtuvieron diferencias significativas entre la longitud del tallo y el medio de cultivo. (Ver Tabla 20 del Anexo 2).



**Figura 5: Longitud de tallo a los 120 días: Control (WP); T2 (IBA 0.5 ppm); T5 (ANA 0.75+GA3 1.0).**

#### **b. Número de brotes**

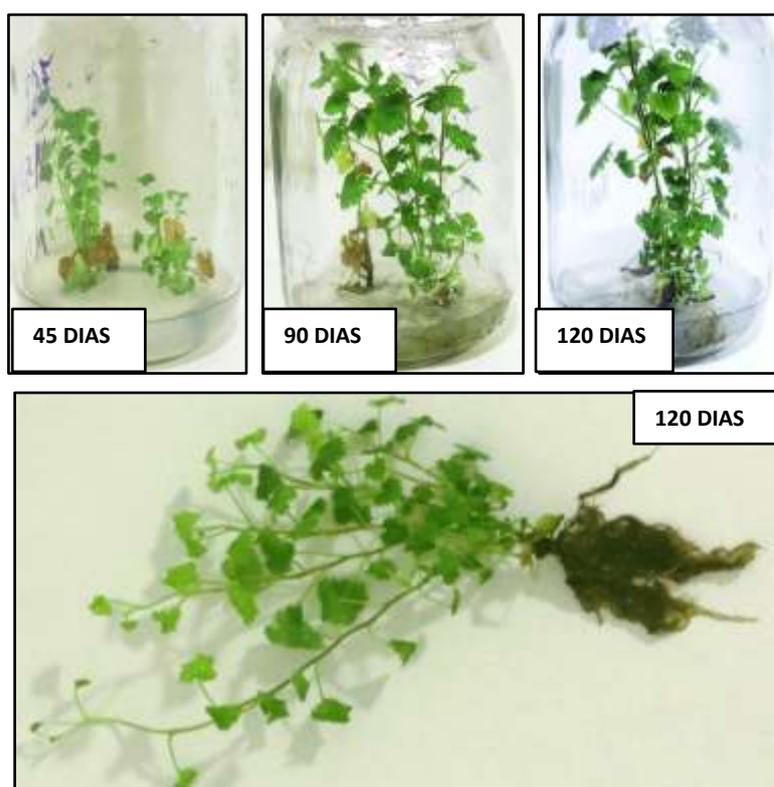
En las Tabla 21 y 22, del Anexo 2 se muestran los gráficos de barras y valores de promedios y otros datos.

A los 45 días de sembrado los explantes se observó un mayor número de brotes en los explantes desarrollados en el medio de cultivo T4 (BAP 1.0+GA3 0.5) con un promedio de 4.083 brotes.

En el día 90 se observó un mayor número de brotes del explante en el medio de cultivo M4 (BAP 1.0+GA3 0.5) con un promedio de 4.667. En el día 120 se observó

un mayor número de brotes del explante en el medio de cultivo T4 (BAP 1.0+GA3 0.5) con un promedio de 5.083.

En la Figura 6 se muestra el desarrollo de brotes en T4 (BAP 1.0+GA3 0.5) en el transcurso de todo el experimento, ya que este medio mostró mayor cantidad de brotes en comparación con el control y los demás tratamientos, se observó también que las plantas empezaron a generar brotes desde la base del tallo principal sembrado, sin embargo se notó desde un inicio, es decir 45 días, hojas marchitas en la base y tallos delgado como se muestra en las fotos, y en simultáneo la generación de abundantes raíces.



**Figura 6: Número de brotes en plántulas desarrolladas en el medio T4 (BAP 1.0+GA3 0.5) a los 45, 90 y 120 días.**

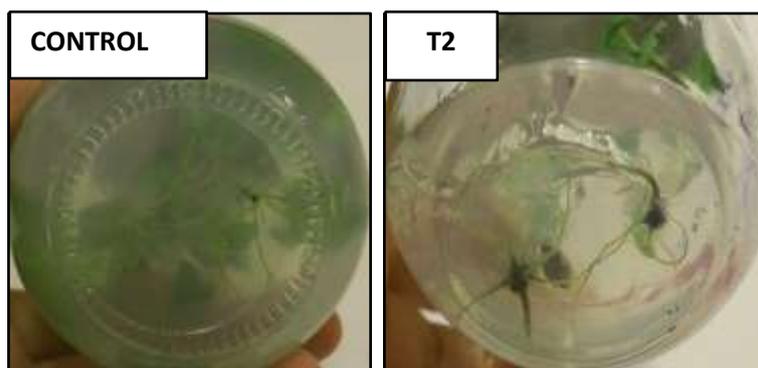
El análisis estadístico utilizando la prueba de ANOVA demostró que el número de brotes es diferente entre cada uno de los medios ( $p=0.05$ ), en los días de evaluación (45, 90 y 120). (Ver Tabla 23 del Anexo 2).

La comparación de la longitud de tallo entre los diferentes tratamientos se realizó utilizando el método de comparación múltiple Sidak-Bonferroni. De acuerdo a este método se obtuvieron diferencias significativas entre la longitud del tallo y el medio de cultivo. (Ver Tabla 25 del Anexo 2).

**c. Número de raíces**

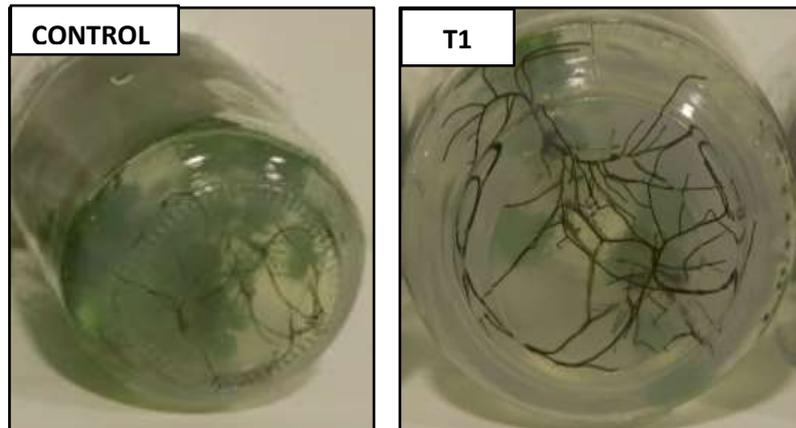
En las Tabla 26 y 27, del Anexo 2 se muestran los gráficos de barras y valores de promedios y otros datos.

A los 45 días de sembrado los explantes el número de raíces desarrolladas en plántulas sembradas en el medio de cultivo T2 (IBA 0.5 ppm) fue mayor, con un promedio de 2.417 raíces. No habiéndose observado desarrollo de raíces en aquellas sembradas en el medio T7 (BAP 2.0+ANA 0.1+GA3 0.2).



**Figura 7: Número de raíces a los 45 días Control (WP); T2 (IBA 0.5 ppm). A los 45 días**

A los 90 días se observó un mayor número de raíces del explante en el medio de cultivo T1 (ANA 0.75 ppm) con un promedio de 2.333, T2 (IBA 0.5 ppm) con un promedio de 2.25 raíces.



**Figura 8: Número de raíces a los 90 días Control (WP); T1 (ANA 0.75 ppm).**

A los 120 días se observó un mayor número de raíces del explante en el medio de cultivo T2 (IBA 0.5 ppm) con un promedio de 2.583.



**Figura 9: Número de raíces a los 120 días Control (WP); T1 (IBA 0.5 ppm).**

El análisis estadístico utilizando la prueba de ANOVA demostró que el número de raíces es diferente para cada uno de los medios ( $p=0.05$ ) en relación a los días de evaluación (45, 90 y 120). (Ver Tabla 28 del Anexo 2).

La comparación del número de raíces entre los diferentes tratamientos se realizó utilizando el método de comparación múltiple Sidak-Bonferroni. De acuerdo a este método se obtuvieron diferencias significativas entre el número de raíces y el medio de cultivo. (Ver Tabla 30 del Anexo 2).

#### **d. Número de hojas vivas**

En las Tabla 31 y 32, del Anexo 2 se muestran los gráficos de barras y valores de promedios y otros datos.

A los 45 se observó un mayor número de raíces del explante en el medio de cultivo T4 (BAP 1.0+GA3 0.5) con un promedio de 16.167.

En el día 90 se observó un mayor número de raíces del explante en el medio de cultivo T4 (BAP 1.0+GA3 0.5) con un promedio de 29.667.

En el día 120 se observó un mayor número de raíces del explante en el medio de cultivo T4 (BAP 1.0+GA3 0.5) con un promedio de 43.333.

En esta última evaluación se observó que la variable referida a las hojas se notó que éstas poseían hojas enrolladas hacia abajo, su aspecto era verde y tenían un buen tamaño. Cabe destacar que este aspecto se observó en todos los tratamientos.

El análisis estadístico utilizando la prueba de ANOVA demostró que la longitud de tallo es diferente entre cada uno de los medios ( $p=0.05$ ), en los días de evaluación (45, 90 y 120). (Ver Tabla 33 del Anexo 2).

La comparación de la longitud de tallo entre los diferentes tratamientos se realizó utilizando el método de comparación múltiple Sidak-Bonferroni. De acuerdo a este método se obtuvieron diferencias significativas entre el número de hojas y el medio de cultivo. (Ver Tabla 35 del Anexo 2).

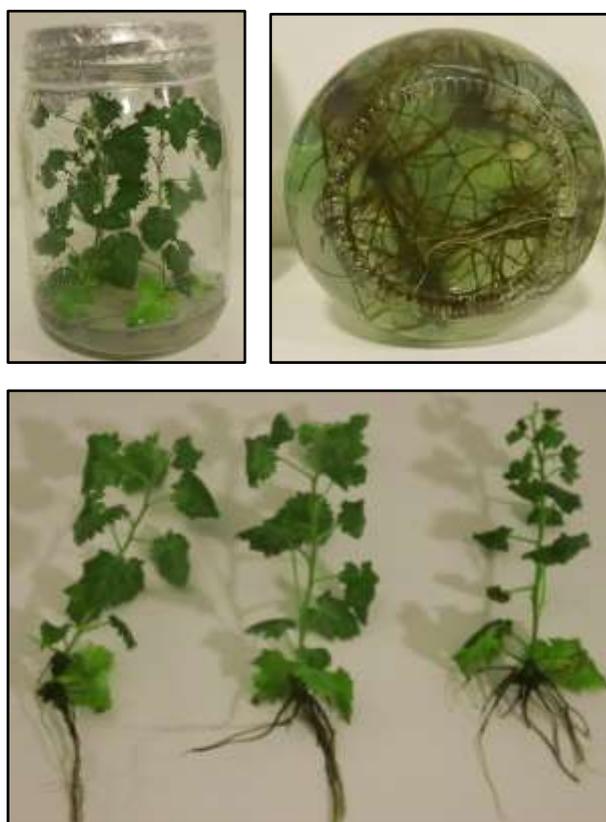
#### **4.1.3. Análisis de resultados**

El mejor resultado que se obtuvo fue el tratamiento T4, compuesto por WP suplementado con BAP 1.0+GA3 0.5, ya que fue el que manifestó mayor cantidad de brotes y raíces abundantes a lo largo del experimento, sin embargo no fue el que presentó mayor longitud de tallo, uno de los detalles no favorables fue lo débil que se veían los tallos, no solo en este tratamiento sino en todos a lo largo de los días de evaluación. También se observó que

en las últimas evaluaciones (120 días) las hojas estaban enrolladas hacia abajo, este aspecto fue compartido en todos los tratamientos del experimento, como ya se mencionó anteriormente.

En el grupo de tratamientos anteriores se había considerado la suplementación de WP con auxinas como ANA e IBA, esta última hormona vegetal fue probada en concentraciones muy bajas como 0.5 ppm o acompañada con otras hormonas, no teniendo resultados tan favorables como los otros tratamientos.

Se tomó en consideración un último tratamiento, T10, que consiste en WP suplementado con IBA 2.0 ppm, ya que en el laboratorio CIRGEBB se realizaron ensayos utilizando esta hormona a esta concentración, y los resultados que se observaron fueron favorables ya que presentaron tallos más gruesos, es decir resistentes, así como también el largo del mismo, con entrenudos medianos (brotes) significando una mayor tasa de multiplicación. Se observó a sí mismo que igual o mayor a los 90 días las hojas empezaron a enrollarse hacia abajo. El tratamiento fue evaluado a 60 días, en comparación del tratamiento de T4. A continuación se muestran algunas fotografías para verificar lo afirmado anteriormente.



**Figura 10: Tratamiento T10 (WP + IBA 2.00 ppm) a los 60 días.**

## 4.2. Discusiones

### 4.2.1. Establecimiento

#### a. Longitud de tallo

Para todas las variables (longitud de tallo, número de raíces, tamaño y número de hojas) se evidenció mejor resultado en los explantes sembrados en el medio basal WP, esto debido a que el medio Woody Plant posee concentraciones relativamente bajas de sales  $\text{NH}_4^+$  (5 mM),  $\text{NO}_3^-$  (9.7 mM) y  $\text{Cl}^-$  (1.3 mM) a diferencia del medio MS que para éstas sales su concentración es mayor es decir mayor concentración de iones amonio  $\text{NH}_4^+$  (20.6 mM), iones nitrato  $\text{NO}_3^-$  (39.4 mM), iones cloro  $\text{Cl}^-$  (6.0 mM) y  $\text{MoO}_4^-$  (1.0 mM) (Cassells y Curry, 2001). Es decir los explantes responden mejor a concentraciones bajas de sales (Veirskov *et al.*, 1988).

Existen plantas que presentan toxicidad en altas concentraciones de sales, tales como el cultivo de plantas leñosas (Lloyd y McCown, 1981). Parada y Villegas (2009) afirman que el  $\text{CaCl}_2$  es considerado tóxico, motivo por el cual reformularon el medio WPM, el cual carece de cloruro de calcio.

Munns *et al.* (2005) afirman que entre las sales que principalmente afectan las plantas, se encuentran las relacionadas con sulfatos y cloruros de cationes citotóxicos provenientes de metales alcalinos y alcalinotérreos como calcio, sodio y magnesio (Chinnusamy *et al.*, 2005). La acumulación de sales en la zona radical y en tejidos de la planta causa estrés osmótico e interrumpe la homeostasis iónica celular a través de la inhibición de la toma de nutrientes esenciales y la acumulación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  hasta niveles potencialmente tóxicos dentro de las células (Marschner, 2002; Rui *et al.*, 2009; Memon *et al.*, 2010).

Según Morard y Henry (1998), el potencial osmótico del medio de cultivo tiene efecto directo en el crecimiento de los explantes, pues conforme se reduce también se reduce la absorción de agua y nutrientes, lo que dificulta el crecimiento y multiplicación de brotes. Por su parte Pierik (1990) señala que la concentración

total de las sales de un medio de cultivo determina su potencial osmótico, de modo que al aumentar la concentración de iones en la solución el potencial osmótico se reduce (Larqué-Saavedra y Trejo, 1990), al igual que la salinidad que reduce el transporte del agua y asimilación de nutrientes (Silva *et al.*, 2004).

Finalmente Darias (1993), menciona que la altura final del explante está influenciada por las características fisiológicas

Vicente (2001), indica que, el hecho de no hallar diferencias significativas, refleja que los elementos en estudio, están influenciados por otro tipo de factores, que restringen su expresión, como ser temperatura, luz, fotoperiodo, humedad.

#### **b. Número de hojas vivas**

El número y tamaño de hojas fue mayor en los medios de WP a los 45 y 90 días. Tanto el tamaño de las hojas, que fueron grandes, como la coloración que tenían verde intenso. A diferencia de los microesquejes sembrados en medios de Murashige y Skoog, donde las hojas presentaban áreas cloróticas y necrosis en las hojas basales. Según Lerner (1985) y Mesa (2003), estos síntomas son debidos al efecto tóxico de los iones, como resultado de altos contenidos de solutos en el medio y por el estrés hídrico impuesto por la disminución del potencial osmótico.

El WPM tiene menor concentración de sales minerales en comparación con el MS y es ampliamente empleado para el cultivo de tejidos de plantas leñosas o sensibles a la salinidad (Cardoza, 2008). Además, en el MS el contenido de nitrógeno amoniacal y nítrico es mayor que en el WPM y las fuentes de nitrógeno nítrico son diferentes, para el MS es el  $\text{KNO}_3$  y en el WPM es  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Sin embargo, la proporción nitrógeno nítricoamoniacal es mayor en el WPM. Es de destacar que el nitrato representa una de las formas más asimilables de nitrógeno por parte de la planta, que promueve la formación de hojas y nuevos brotes. En este sentido, Barwale *et al.* (1986) señalaron que las deficiencias de nitrógeno pueden afectar la brotación, provocan disminución en el número de brotes por explante y favorecen el crecimiento de brotes con tallos finos y cortos con hojas pequeñas.

Vicente (2001), indica que, el hecho de no hallar diferencias significativas, refleja que los elementos en estudio, están influenciados por otro tipo de factores, que restringen su expresión, como ser temperatura, luz, fotoperiodo, humedad.

#### **4.2.2. Micropropagación**

##### **a. Longitud de tallo**

Jiménez (1999), indica que la variación de la altura del explante puede deberse al tamaño del explante introducido en la etapa de establecimiento; lo que provoca una regeneración y crecimiento más rápido; y a las características fisiológicas propias de cada ecotipo.

Las auxinas tales como el ácido Indol butírico (IBA) y el ácido Naftalenacético (ANA) son hormonas vegetales sintéticas a comparación del ácido Indol acético (AIA). Debido a ello es que no se presentaron diferencias entre los tratamientos que contenían en sus medias estas dos hormonas.

Si bien las auxinas están más orientadas al desarrollo de raíces, la combinación de estas con otras hormonas como las giberelinas, provocan el aumento de auxinas endógenas. Según Torres et al (1996) estas hormonas pueden encontrarse entre 0.1 a 1.0 ppm. Cabe indicar que niveles superiores a 1.0 mg/l de AG3 son tóxicos (Van Braga y Pierik, 1971).

##### **b. Número de brotes**

Hurtado y Merino (1994), señalan que la presencia auxinas (AIA) y citocininas (BAP), favorecen al desarrollo de brotes adventicios, en los experimentos llevados a cabo el tratamiento que dio los mejores resultados en cuanto a número de brotes es el medio WP suplementado con BAP 1.0 ppm + GA3 0.5 ppm (T4).

En la multiplicación *in vitro* las citoquininas como componente importante en el medio de cultivo promueven la división celular, proliferación de yemas axilares y neoformación de órganos *in vitro* (Azcon, 2000; García y Martínez, 1994; Saldivar, 1994). Como ejemplo en cultivo *in vitro* de mora de castilla se evaluó la hormona

sintética 6-bencil aminopurina (BAP); donde es una de las más utilizadas para estimular el crecimiento y desarrollo, división celular, alargamiento celular, iniciación y crecimiento de raíces (Rojas y Ramírez, 1991). Según Najaf-Abadi A. Jafari si Y Hamidoghli (2009) probaron con una variedad de zarzamora sin espinas. El mejor tratamiento para la etapa de multiplicación fue el de MS con 2 mg/l BAP y 0.3 mg/l GA3.

Marulanda *et al.* (2000) emplearon un medio de cultivo con BAP (1 mg/l) y AG3 (1mg/l) para el establecimiento *in vitro* de plantas de *R. glaucus*, y obtuvieron explantes con buen desarrollo con un promedio de tres brotes por explante.

En el cultivo de meristemas de mora de castilla, la utilización de GA3 presentó mejores resultados a niveles de 0.03 mg/l en combinación de 2.5 mg/l de BAP, brindando una mayor producción de hojas e hijos básicos para la propagación masiva; aunque plantas de porte relativamente pequeñas (Muñoz y Reyes, 2006).

Además debe considerarse que la relación auxina/citoquinina en el medio de cultivo es favorable ya que ayuda a la formación de brotes, de lo contrario promueve el enraizamiento y la callogénesis (Smith, 2012; Dixon, 1994), este aspecto fue observado en los explantes sembrados en los medios T7 y T8, que contienen BAP y ANA, manifestando un desarrollo muy distinto por su poca altura y aspecto enrosetado. Esto fue observado por Erig y Luces (2002) al evaluar 6BAP y IBA en la multiplicación *in vitro* de frambuesa (*R. idaeus*), observaron que en medios de cultivo con niveles crecientes de BAP y concentraciones variables de IBA, se presenta reducción en el promedio de longitud de los tallos, señalando que el uso de IBA es tóxico en niveles altos de citoquinina, lo cual se manifiesta con la forma de roseta de las plántulas.

Por último Pierik, 1990 señala que existe una relación entre los medios de cultivo y el número de brotes, estando relacionada con la capacidad de regeneración de brotes, que es genotipo dependiente, , las condiciones ambientales (suministro de nutrientes, reguladores, condiciones físicas) y el estado de desarrollo de la

vitroplanta.

**c. Número de raíces**

Según los resultados se observa que no existe diferencias de desarrollo radicular entre los diferentes tratamientos, sin embargo el medio T2 cuyo componente era únicamente ácido indol butírico al 0.5 ppm fue el que presentó mayor número de raíces, ello se debe a que la hormona auxina (IBA) promueve el crecimiento y desarrollo de raíces.

Cabe mencionar que con una baja concentración de auxinas predomina la formación de raíces adventicias, mientras que con altas concentraciones de auxinas no se produce raíces, y tiene lugar, en cambio, a la formación de callos, adicionalmente es preciso tomar nota que la luz provoca un efecto inhibitor sobre la formación de raíces, ya que las plantas cultivadas en la oscuridad enraízan mejor (Pierik, 1991).

Por último Darías (1993) indica que la diferencia en el número de raíces que se observan entre evaluaciones sucesivas puede ser atribuible a las características fisiológicas propia de cada ecotipo.

**d. Número de hojas vivas**

Muñoz y Reyes (2006) hallaron que en el cultivo de mora de castilla (*Rubus glaucus*) el uso de AG3 dio mejores resultados en combinación con BAP, tales resultados fueron una mayor producción de hojas y propágulos para ser multiplicados masivamente. De acuerdo con Gómez (2002), la formación de hojas es un proceso fisiológico que favorece el desarrollo de otros órganos como son raíces y brotes. Es por ello que el medio T4 que contiene BAP 1.0 ppm + AG3 1.0 ppm obtuvo los mejores resultados tanto en el número de hojas como en el número de brotes.

Al respecto Smith (2012), indica que para promover el mayor número de hojas se debe considerar la relación auxina/citoquinina favoreciendo también el

enraizamiento.

En cuanto a esta mínima variación que se observó en los otros tratamientos que no presentaron diferencias entre sí, Vicente (2001), responde que mientras menor sea el rango de variación obtenido en los tratamientos evaluados, mayor es la homogeneidad proporcionada al explante, al momento de la formación de hojas.

**e. Último tratamiento realizado en el laboratorio CIRGEBB**

El último tratamiento (WP + IBA 2.00 ppm) que se evaluó por tener mejores resultados que los plateados inicialmente, consistió en la suplementación del medio WP con la auxina IBA a una concentración mucho más alta, según Weaver (1985) la auxina IBA es uno de los estimulantes del enraizamiento, el cual tiene una actividad auxínica débil y los sistemas de enzimas destructores de auxinas la destruyen en forma relativamente lenta. El ácido indolbutírico (AIB) es un fitorregulador auxínico sintético comúnmente utilizado por su estabilidad, ya que es muy resistente a la oxidación por la luz, enzimas u otros agentes (Azcón-Bieto y Talón 2000). Los sistemas de enzimas destructores de auxinas la destruyen en forma relativamente lenta, además se desplaza muy poco, se retiene cerca del sitio de aplicación (Weaver, 1990), y es fotoestable (Hartmann y Kester, 1990).

La estimulación de las raíces, permitirán que los nutrientes del medio de cultivo sean asimilados con mayor eficiencia por los tejidos de las planta, fortaleciendo de esta forma los tallos, ya que las auxinas en general están orientadas a la formación de brotes, como menciona Montaldo (1979), el uso de ácidos Indol butírico, Indol acético y Naftalenacético, para estimular la producción de raíces fibrosas y de brotes en las estacas.

## V. CONCLUSIONES

1. Para la etapa de establecimiento se observó mejor resultados a los explantes sembrados en medio basal medio Lloyd y McCown (1981) conocido como medio Woody Plant (WP) comparado con el medio basal MS (Murashige & Skoog), esto debido a que esta especie responde mejor en medios con menor concentración de sales.
2. Los explantes desarrollaron en el medio WP manifestando buena longitud del tallo, número de hojas y desarrollo de raíces, consiguiéndose plántulas óptimas para la siguiente fase que es la multiplicación o micropropagación.  
En la etapa de multiplicación se observó mejores resultados al utilizar el medio constituido por medio basal WP suplementado con IBA 2.0 ppm

## **VI. RECOMENDACIONES**

Dado a los favorables resultados de las etapas de establecimiento, multiplicación, se recomienda continuar con la etapa de aclimatación en condiciones de invernadero y posteriormente la siembra en campo, recomendando utilizar plántulas de 60 días después de la multiplicación.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, A.K. & Finn, C.E. (1996). Geographical influences on morphological variation in *Rubus ursinus* subsp. *macropetalus*. *HortScience* 31(4):609. Sólo resumen.
- Augé, G.R.; Beauchesne, G.J.; Boocon-Gibod, L.; Decurtye, B. & Vitalie, H. (1986). Cultivo *in vitro*. Científica, S.A. de C.V. México D.F, MX. pp. 4-36.
- Azcon, T.A. (2000). Fundamento de fisiología vegetal. Universidad de Barcelona. España. pp.535.
- Bhojwani, S. & Dantu, P. (2013). Plant Tissue Culture: an introductory text. IN, Springer. pp. 301.
- Barwale, U.; Kerns, H. & Widholm, M. (1986). Plant regeneration from callus culture of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 167: 473-481.
- Bon, M.C.; Bonal, D.; Goh, D.K. & Monteuuis, O. (1998). Influence of different macronutrient solutions and growth regulators on micropropagation of juvenile *Acacia mangium* and *Paraserianthes falcataria* explants. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 53 (3): 171-177.
- Brown, S.W. (1943). The origin and nature of variability in the Pacific Coast blackberries (*Rubus ursinus* Cham. & Schlecht. and *R. lemorum* sp. nov.). *American Journal of Botany*. 30 (9):686–697.
- Cano, C.M. (2013). Aplicación de la micropropagación criopreservación a la conservación ex situ de especies vegetales de interés. (Tesis Ph. D.). Alicante, España: Universidad de Alicante. pp. 191.

- Capuana, M. & Giannini, R. (1997). Micropropagation of young and adult plants of cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *Journal of Horticultural Science* 72 (3): 453-460.
- Cardoza, V. (2008). Tissue culture: The manipulation of plant development. En: Stewart, CN, Wiley J. (Ed). *Plant biotechnology and genetic: principles, techniques, and applications*, pp. 113-134. Inc. Knoxville, Tennessee.
- Cassells, A.C. & Curry, R.F. (2001). Oxidative stress and physiological epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 64:145-157.
- Centro de Comercio Internacional-COMTRADE. (2011). *Investigación de Mercados*, Genova, Suiza. Febrero del 2011. Consultado en <http://www.trademap.org>.
- Chinnusamy, V.; Jagendore, A. & Jian-Kang, Z. (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci.* 45(2), 437-448. Doi: 10.2135/cropsci2005.0437
- Coronado García, M.A.; García Porchas, M.; Santiago Hernández, V.G.; Córdova Yáñez, A. & Vásquez Navarro, R.A. (2014). La zarzamora, un mercado potencial para los productores agropecuarios de La Sierra de Sonora. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal* 34: 784-794.
- Cortell, J.M. & Strik, B.C. (1997). Effect of Floricane Number in “Marion” Trailing Blackberry. II. Yield Components and Dry Mass Partitioning. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122(5): 611-615.
- Crocker, T.E.; Sherman, W.B. (1998). *The blackberry*. University of Florida. Cooperative Extension Service. pp. 5.
- Darias, R. (1993). *Recopilación de temas sobre técnicas de cultivo in vitro*. Oruro, Bolivia: Ediciones UTO y UCCM, Cuba.
- Daubeney, H.A. (1996). *Brambles. Fruit Breeding: Vine and Small Fruits*. Eds. J Janick; JN

- Moore. John Wiley and Sons, Inc. New York, NY. V. 2. pp. 109-190.
- Debergh, P. & Maene, L. (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Hort.* 14: 335-345.
- Del Solar, C. (1985). Usando técnicas de cultivo de tejidos. Micropropagación de plantas. *Próxima Década.* 38:24-26.
- El comercio. (04 de Agosto de 2016). Sierra Exportadora: Producción de arándanos se duplicará el 2016. Recuperado el 22 de Diciembre de 2016, de <http://elcomercio.pe/economia/negocios/sierra-exportadora-produccion-arandanosduplicara-2016-244485>
- Erig, A. & Luces, G. (2002). 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na complicacao *in vitro* da amoreira preta (*Rubus idaeus* L.) cv. Tupy. *Ciencia Rural* 32(5):765 – 770.
- Evans, D.A.; Sharp, W.R. & Flick, C.E. (1981). Growth and Behavior of Cell Cultures: Embryogenesis and Organogenesis. Eds. TA Thorpe. *Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture.* Academic. US. pp. 89-91.
- Finn, C.E.; Strik, B.C. & Lawrence, F.J. (1997). Marion trailing blackberry. *Fruit Var. J.* 51(3):130–133.
- Finn, C.E. & Strik, B.C. (2014). Blackberry Cultivars for Oregon. Oregon, US. Consultado mar. 2008. Disponible en <file:///C:/Users/user/Downloads/ec1617-e.pdf>
- Focke, W.O. (1894). Rosaceae. In A. Engler and K. Prantl [eds.], *Die natu'rlichen pflanzenfamilien* 3 (3). pp. 1–60.
- Focke, W.O. (1910). *Species Ruborum monographiae generis Rubi prodromus.* *Bibliotheca Botanica* 17: 1–120.
- Focke, W.O. (1911). *Species Ruborum monographiae generis Rubi prodromus.* *Bibliotheca Botanica* 17: 121–223.

- Focke, W.O. (1914). *Species Ruborum monographiae generic Rubi prodromus*. Bibliotheca Botanica 17: 1–274.
- Galleta, G. & Violette, C. (1989). The Brambles. In: *Brambles Production Guide*. Eds. M Pritts; D Handley. Northeast Regional Agricultural Engineering Service. Ithaca, New York, US. pp. 3 – 8.
- García, J. (2015). *Toponimias de la Provincia de Loja: Significado o etimología de los nombres de: Cantones, ciudades, parroquias, barrios, ríos, montañas, valles, etc.* 1 ed. EC. GRAFICPLUS. pp. 307.
- García, F. & Martínez, B. (1994). *Introducción a la fisiología vegetal*. España: Ediciones Mundi Prensa. pp. 219.
- Gautheret, R.J. (1982). Proceedings of the 5 th. Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. Bot. Mag. pp. 393-410.
- George, E.F. (2008). *Plant Tissue Culture Procedure-Background*. En: George, E. F., Hall M. A, de Klerk GJ (Eds) *Plant Propagation by Tissue Culture*. (3<sup>th</sup> ed.). Vol 1. The Background, pp. 1-28. Springer. Dordrecht
- Hartmann, H.T. & Kester, D.E. (1987). *Propagación de Plantas. Principios y Prácticas*. C.E.C.S.A. (1° ed.). México D.F. pp. 549, 551, 572, 599, 605-607.
- Hartmann, H.T. (1990). *Plant propagation. Principles and practices*. (5<sup>th</sup> ed.). New Jersey, US: Prentice Hall. pp. 647.
- Hartmann, H.T.; Davies, F. & Geneve, R. (2002). *Plant Propagation. Principles and Practices*. New Yersey, US: Prentice Hall. pp. 880.
- Hedrick, U.P. (1925). *The small fruits of New York*. J. B. Lyon, Albany, New York, US. pp. 578.
- Hummer, K.E. (1996). *Rubus diversity*. HortScience 31(2):182-183.

- Hurtado, D.M. y Merino, M.E. (1994). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. México: Trillas S.A. de C.V. pp. 233.
- Ibarra, L.E.; Romero, N.G.; Meuly, R.J. & Hurtado, B.A. (2013). Estudio de factibilidad para la comercialización de zarzamora en mercados internacionales. *Revista internacional administración y finanzas* 6(2): 57-71.
- Iezzoni, A. & Pritts, M. (1991). Applications of principal component to analysis in horticultural research. *Hort Science* 26 (4):334-338.
- Jennings, D.L. (1988). Blackberries. In: Raspberries and blackberries: Their breeding, disease and growth. Academic Press. London, UK. pp. 39–58.
- Jiménez, E. (1999). Aplicaciones de la biotecnología en la mejora genética de plantas y en la producción de semillas. Módulo 4. Propagación Masiva de Plantas *in vitro*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 82.
- Krikorian, A.D. (1991). Propagación clonal *in vitro*. Eds. WM Roca; LA Mroginski. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CÍAT. CO. pp. 95-125.
- Larqué-Saavedra, A. y Trejo, C. (1990). *El Agua en las Plantas*. México: Trillas. pp. 88.
- Lawrence, F.J. (1986). A review of interspecific hybridization in *Rubus*. *Hort Science* 21:58–61.
- Lawrence, F.J. (1989). Naming and release of blackberry cultivar 'Waldo'. U.S. Dept. of Agr., Oregon Agr. Expt. Sta. Release notice.
- Lerner, H. (1985). Adaptation to salinity at the plant cell level. *Plant Soil* 89:3-14.
- Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E. & Mroginski. (2004). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. (2º ed.). Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. pp. 643.

- Litz, R.E. (2005). *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*, Biotechnology in Agriculture. Florida, USA.
- Lloyd, G. & McCown, B. (1981). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Int'l. Plant Prop. Soc. Comb. Proc.* 30: 421–427.
- López, M.J. (2009). Zarzamora: mejoramiento genético principio de manejo del cultivo. *Manejo integral de zarzamora*. pp. 3038.
- Margara, J. (1988). *Multiplificación vegetativa y cultivo in vitro. Los meristemas y la organogénesis*. Madrid, España: Mundi Prensa. pp. 232.
- Marschner, H. (2002). *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press. Amsterdam, The Netherlands.
- Marulanda, M.; Carvajalino, M. & Vento, H. (2000). Establecimiento y multiplicación *in vitro* de plantas seleccionadas de *Rusbus glaucus* Benth. para el departamento de Risaralda (Colombia). *Actual. Biol.* 22(73): 121 – 129.
- Memon, N.M.; Qasim, M.J.; Jaskani & Ahmad, R. (2010). *In vitro* cormel production of gladiolus. *Pak. J. Agri. Sci.* 47(2):115-123.
- Mesa, D. (2003). Obtención de plantas resistentes a la salinidad para los suelos salinos cubanos. *Revista Cubana de Ciencias Agrícolas* 37:217-226.
- Meyer, B.; Anderson, D. & Bohning, R. (1976). *Introducción a la fisiología vegetal*. Buenos Aires, Argentina: Universitaria. pp. 579.
- Monasterio-Huelin & Macía, E. (1992). Revisión taxonómica del género *Rubus* L. (Rosaceae) en la Península Ibérica e Islas Baleares. (Tesis Ph. D.). Madrid, España: Universidad Computense de Madrid. pp. 150.
- Moore, J.N. (1984). Blackberry breeding. *Hort Science* 19:183–185.

- Moore, J.N. & Skirvin, R.M. (1990). Blackberry Management. In: Small Fruit Crop Management. Eds. GJ Galleta; DG Himelrick. Englewood Cliffs, New Jersey, US. pp. 214-244
- Moore, J. N. (1994). Blackberry breeding, management and prospects in North America. En: Primera Reunión Internacional y Segunda Reunión Nacional de frutales nativos e introducidos con demanda Nacional e Internacional Montecillos. México. pp.167 -178.
- Morard, P. & Henry, M. (1998). Optimization of the mineral composition of *in vitro* culture media. *J. Plant Nutr.* 21, 1565–1576.
- Munns, R.; Goyal, S. & Passioura, J. (2005). Salinity and its mitigation. University of California, Davis, California, US.
- Muñoz, M. & Juárez, M. (2006). El mercado mundial de la frambuesa y la zarzamora (en línea). MX. Consultado 17 mayo, 2006. Disponible en <http://www.infoacerca.gob.mex/proafex/frambuesayzarza>
- Muñoz, I. & Reyes, H. (2006). Efecto de reguladores de crecimiento, L-cisteína y ácido ascórbico en el cultivo *in vitro* de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth.). (Tesis de grado). Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua. pp. 27.
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:135- 66.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1974). Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology* 25: 135-166.
- Najaf-Abadi, J. & Hamidoghli, Y. (2009). Micropropagation of thornless trailing blackberry (*Rubus* sp.) by axillary bud explants. *Australian Journal of Crop Science* 3 (4): 191-194.

- Ospina, M. & Aldana, A. (1998). *Producción Agrícola 1. Enciclopedia Terranova*. Sat de Bogota C.D, CO, Terranova editor. pp. 224-225.
- Parada, D.M & Villegas, A. (2009). Propagación *in vitro* del híbrido almendro x durazno H1. *Rev. Fitotec. Mex.* 32: 103-109
- Pérez, E.; Dávila, F.C.A.; Villalobos, A.E.; Cañedo, O.B.O.; LizaldeViramontes, J.H.; De la Rosa, C.M.L.; Domínguez, R.M.S.; Castro, G.I.A. & Pérez-Reyes, E.M. (2008). *Técnicas de cultivo de tejidos aplicados a la propagación y conservación de algunas especies forestales de las zonas semiáridas de México. Ecología, manejo y conservación de los ecosistemas de montaña en México*. México: Mundi Prensa México. Parte III. pp. C16. 329-352.
- Perú 21. (2019). Frambuesas y moras peruanas muestran potencial agroexportador por demanda externa. Lima, Perú. Recuperado de <https://peru21.pe/economia/ccl-frambuesas-moras-peruanas-muestran-potencial-agroexportador-demanda-externa-nndc-484288-noticia/>
- Pierik, R.L.M. (1990). Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. (3º ed.). Madrid, España: MundiPrensa. pp. 29-36.
- Pierik, R.L.M. (1991). Commercial aspects of micropropagation. *In: Prakash, J., and R. L. M. Pierik (eds). Horticulture — New Technologies and Applications*. Springer Netherlands. pp: 141-153.
- Portal Frutícola PE. (2019). Perú: Frambuesas y moras con potencial exportador. Lima, Perú. Consultado 17 jun, 2019. Disponible en <https://www.portalfruticola.com/noticias/2019/06/17/peru-frambuesas-y-moras-con-potencial-exportador/>
- Pritts, M.P.; Handley, D.; Eames-Sheavly, Ohira, A. (1989). Bramble production guide. NRAES -35. Northeast Reg. Agr. Eng. Serv., Ithaca, NY. pp. 189.

- Roca, W.M. & Mroginski, L.A. (1991). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical. pp. 969.
- Rojas, G. & Ramírez, H. (1991). *Control hormonal del desarrollo de las plantas, fisiología-tecnología-experimentación*. (2° ed.). México: Limusa. pp. 56.
- Rodríguez, A.J. (1989). Las zarzamoras erectas 'Brazos', 'Comanche', 'Cheyenne', 'Cherokee' y 'Shawnee' no tienen requerimientos de frío. III Congreso Nacional de la SOMECH. pp. 90.
- Rodríguez, A.J. (1993). Algunas ideas sobre la producción de zarzamora en México. Primera Reunión Nacional sobre frutales nativos e Introducidos. pp. 6-13.
- Romero, S.A. (2016). *El arándano en el Perú y el Mundo: Producción, Comercio y perspectivas 2016*. MINAGRI-DG PA-DEEIA. pp. 41.
- Roveda, G.; Cabra, L. & Ramírez, M. (2008). Uso de microorganismos con potencial como biofertilizantes en el cultivo de mora. Tibaitatá, Colombia, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. pp. 59.
- Rui, L.; Wei, C.; Mu-xiang, J.; Cheng-jun, W.; Min & Y. Bo-ping. (2009). Leaf anatomical changes of *Burquieria gymnorhiza* seedlings under salt stress. *J. Trop. Subtrop. Bot.* 17(2), 169-175.
- Sagawa, Y. & Kunisaki, J.T. (1990). *Micropropagation of floricultural crops*. Eds. PV Ammirato; DA Evans; WR Sharp; PS Bajaj. New York, US: McGraw-Hill. pp. 25-56.
- Saldivar, L.H.R. (1994). *Fisiología Vegetal*. (1° ed.). Universidad Autónoma Agraria Antonio Navarro. México: Editorial Trillas.
- Santana, L.I. (2015). Análisis molecular y micropropagación de *Helianthemum inaguae* Marrero Rodr., González-Martín & González-Artiles y *Pericallis hadrosoma*

(Svent.) B. Nord. pp. 63.

Schleiden, M.J. (1838). "*Beiträge zur phytogenesis*" in *Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin*. (1st edn.). Vol 608. ed. Johannes M., editor. (Berlin: Jahrgang) 5, 137–176.

Schwann, T. (1839). *Mikroskopische Untersuchungen über die Uebereinstimmung in der Struktur und dem Wachsthum der Thiere und Pflanzen*. Berlin: Sander.

Sierra Exportadora. (11 de mayo de 2016). Trabajo de Sierra Exportadora incrementó la exportación de arándanos. Obtenido de <http://blog.camexperu.org.pe/trabajo-de-sierra-exportadora-en-la-exportacion-dearandanos/>

Silva, M.R., Silva, M.S. & Oliveira, J.S. (2004). Stability of ascorbic acid in refrigerated and frozen cerrado cashew apple. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 34(1): 9-14.

Seemann, P. (1993). Utilización de técnicas de Micropropagación. Eds. P. Barriga; M. Neira. CL. pp. 87-145.

Skoog, F. & Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-131.

Smith, R. (2012). *Plant tissue culture: Techniques and experiments*. Londres, UK. Academic Press Elsevier. pp. 208.

Thompson, M.M. (1997). Survey of chromosome number in *Rubus* (Rosaceae: Rosoideae). *Ann. Mo. Bot. Garden* 84:129–165.

Thompson, M.M. (1995a). Chromosome numbers of *Rubus* cultivars at the National Clonal Germplasm Repository. *Hort Science* 30:1453– 1456.

Thompson, M.M. (1995b). Chromosome numbers of *Rubus* species at the National Clonal Germplasm Repository. *Hort Science* 30:1447–1452.

- Torres, K. (1988). *Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops*. New York, US, Van Nostrand Reinhold. pp. 31-34, 53-60, 66-68.
- Tsao, C.W.V. (1999). *Rubus leaf regeneration and micropropagation of virus infected raspberry*. Ore. (Tesis Mag. Sc.). US: Universidad Estatal de Óregon. pp. 147.
- United States Department of Agriculture, USDA. (s.f.). Classification for Kingdom Plantae Down to Genus Rubus L. EU. Recuperado de <https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=RUBUS&display=31#>
- Van Braga, J. & Pierik, R.L.M. (1971). The Effect of Autoclaving on the Gibberellins Activity of Aqueous Solutions Containing Gibberellin AG3. Misc. Papers. Landbouwhoge School Wageningen. 9: 1-147., J.; Pierik, RL M. 1971. The Effect of Autoclaving on the Gibberellins Activity of Aqueous Solutions Containing Gibberellin AG3. Misc. Papers. Landbouwhoge School Wageningen. 9: 1-147.
- Vicente, R.J. (2001). *Guía metodológica de diseños experimentales*. Universidad Mayor de San Andres. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia. pp. 175.
- Waldo, G.F. & Wiegand, E.H. (1942). Two new varieties of blackberry the Pacific and the Cascade. Oregon Agr. Expt. Sta. Circ. 269.
- Waldo, G.F. (1950). Breeding blackberries. Ore. State College Agr. Expt. US, Sta. Bul. pp. 475.
- Waldo, G.F. (1957). *The Marion Blackberry*. Oregon State College, Corvallis, Ore. Circular of Information 571. pp. 7.
- Waldo, G.F. (1968). Blackberry breeding involving native Pacific Coast parentage. *Fruit Var. J.* 22:3-7.
- Wareing, R.F. & Phillips, I.D. (1973). *The control of growth and differentiation in plants*. Pergamon press. UK. pp. 308.

Weaver R.J. (1985). *Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura*. Trad. por Agustín Contín. México: Trillas. pp. 622.

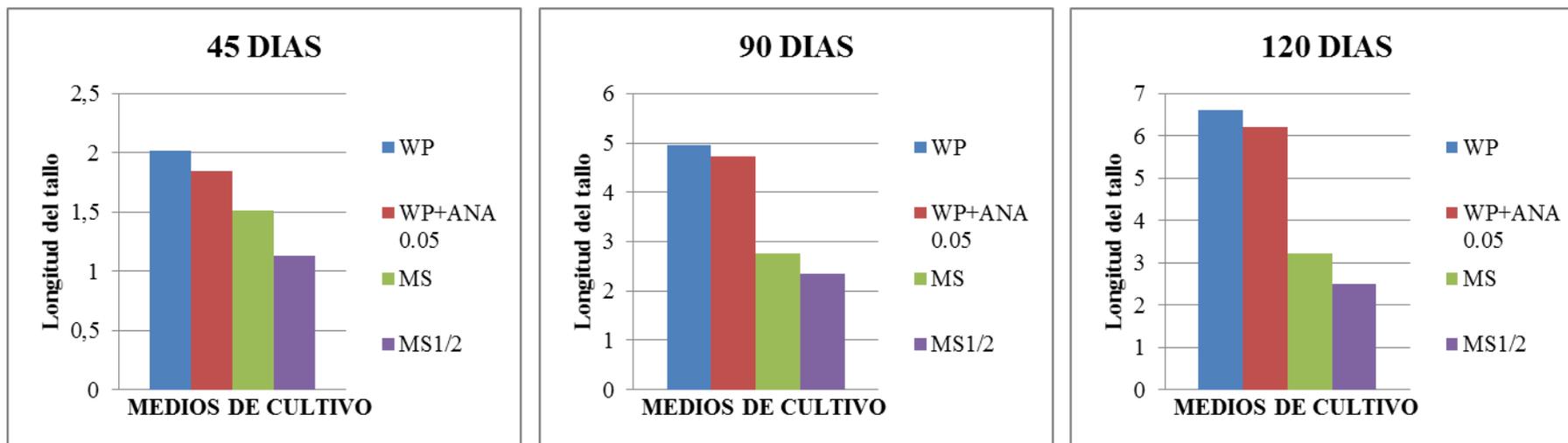
Weaver, R.J. (1990). *Reguladores del Crecimiento de las plantas en la Agricultura*. México D.F.: Trillas. pp. 17-141.

## **VIII. ANEXOS**

## Anexo 1: Tablas y gráficos estadísticos de la Etapa de establecimiento

### LONGITUD DE TALLO

Tabla 6: Gráficos de barras de la longitud del tallo



**Tabla 7: Datos descriptivos**

45 DIAS					90 DIAS					120 DIAS				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
WP	12	24.2	2.016667	0.396061	WP	12	59.6	4.967	1.786	WP	12	79.2	6.6	3.88909
WP+ANA 0.05	12	22.1	1.841667	0.668106	WP+ANA 0.05	12	56.7	4.725	5.835	WP+ANA 0.05	12	74.6	6.21667	5.15242
MS	12	18.2	1.516667	0.150606	MS	12	33.2	2.767	0.392	MS	12	38.7	3.225	0.37295
MS1/2	12	13.6	1.133333	0.242424	MS1/2	12	28.2	2.350	2.515	MS1/2	12	29.9	2.49167	3.22083

**Tabla 8: Análisis de Varianza**

45 DIAS					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	5.446	3	1.815	4.983	0.004615
Dentro de los grupos	16.02917	44	0.364		
90 DIAS					
	21.47479	47			
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	64.18396	3	21.39465	8.129	2.04E-04
Dentro de los grupos	115.8058	44	2.631951		
Total	179.9898	47			

«continuación»

120 DIAS
----------

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	155.338	3	51.7794	16.392	2.70E-07
<b>Dentro de los grupos</b>	138.988	44	3.15883		
<b>Total</b>	294.327	47			

**Tabla 9: Modelo Lineal**

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M.</b>	<b>F-cal</b>	<b>p-Valor</b>	<b>Significancia</b>
<b>Bloques</b>	11	471.612	42.874	16.38	0.00001	***
<b>Tiempo</b>	2	361.737	180.869	69.09	0.00001	***
<b>Tratamiento</b>	3	91.585	30.528	11.66	0.00001	***
<b>Tratamiento*tiempo</b>	6	18.291	3.048	1.16	0.329	NS
<b>Error</b>	132	345.537	2.617			
<b>Total</b>	143	817.150	5.714			

GL = grados de libertad

SC= suma de cuadrados

CM= cuadrado medio

F= estadístico de prueba

P= estadístico de significancia

Significancia: \* p=0.05-0.01, \*\*p=0.01-0.001, \*\*\*p=0.001-0.0001

**Tabla 10: Comparación múltiple entre los diferentes medios de cultivo utilizando el método Sidak-Bonferroni.**

**45 DIAS**

		<i>p-valor</i>
<b>WP vs WP+ANA 0.05</b>	-0.175	1
<b>WP vs MS</b>	-0.5	0.291
<b>WP vs MS1/2</b>	-0.883	0.005
<b>WP+ANA 0.05 vs MS</b>	-0.325	1
<b>WP+ANA 0.05 vs MS1/2</b>	-0.708	0.037
<b>MS vs MS1/2</b>	-0.383	0.762

**90 DIAS**

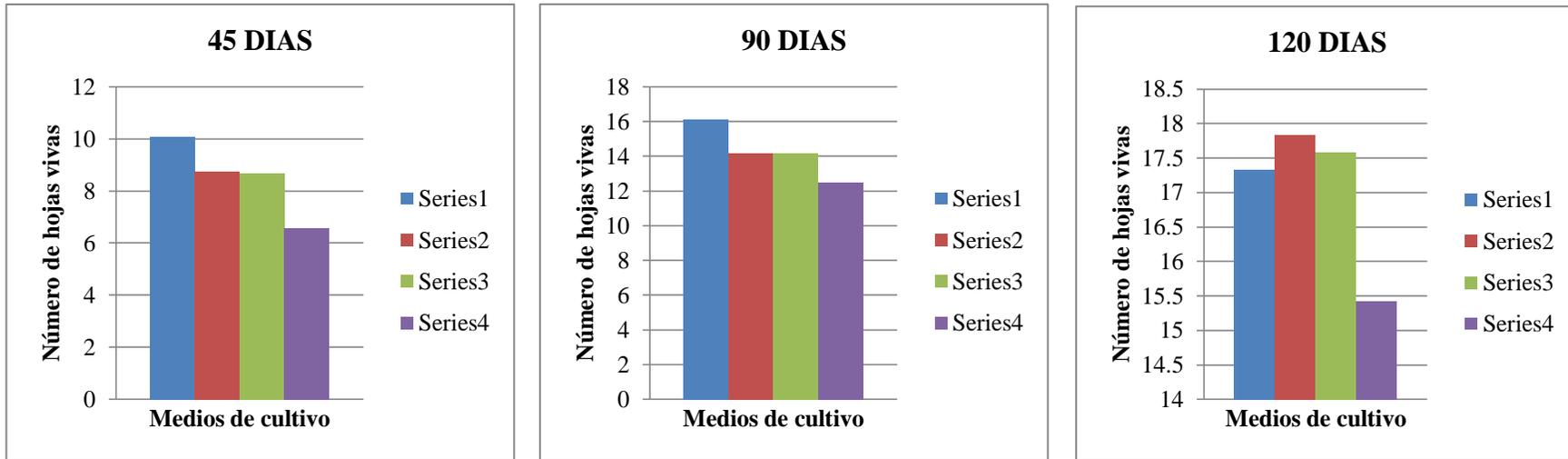
		<i>p-valor</i>
<b>WP vs WP+ANA 0.05</b>	-0.242	1
<b>WP vs MS</b>	-2.2	0.011
<b>WP vs MS1/2</b>	-2.617	0.002
<b>WP+ANA 0.05 vs MS</b>	-1.958	0.03
<b>WP+ANA 0.05 vs MS1/2</b>	-2.375	0.005
<b>MS vs MS1/2</b>	-0.417	1

**120 DIAS**

		<i>p-valor</i>
<b>WP vs WP+ANA 0.05</b>	-0.383	1
<b>WP vs MS</b>	-1.883	0.253
<b>WP vs MS1/2</b>	-2.108	0.142
<b>WP+ANA 0.05 vs MS</b>	-1.5	0.615
<b>WP+ANA 0.05 vs MS1/2</b>	-1.725	0.370
<b>MS vs MS1/2</b>	-0.225	1

## NÚMERO DE HOJAS VIVAS

**Tabla 11: Gráficos de barras de número de hojas vivas.**



**Tabla 12: Datos descriptivos**

45 DIAS				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
WP	12	121	10.083	2.083
WP+ANA 0.05	12	105	8.750	12.932
MS	12	104	8.667	1.515
MS1/2	12	79	6.583	12.629

90 DIAS				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
WP	12	193	16.083	6.083
WP+ANA 0.05	12	170	14.167	35.242
MS	12	170	14.167	5.606
MS1/2	12	150	12.500	54.273

120 DIAS				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
WP	12	208	17.333	11.152
WP+ANA 0.05	12	214	17.833	52.515
MS	12	211	17.583	2.629
MS1/2	12	185	15.417	76.629

**Tabla 13: Análisis de Varianza**

**45 DIAS**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	75.229	3	25.076	3.440	0.0247
<b>Dentro de los grupos</b>	320.750	44	7.290		
<b>Total</b>	395.979	47			

**90 DIAS**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	77.229	3	25.743	1.017	0.394
<b>Dentro de los grupos</b>	1113.25	44	25.301		
<b>Total</b>	1190.479	47			

**120 DIAS**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	43.750	3	14.583	0.408	0.748
<b>Dentro de los grupos</b>	1572.167	44	35.731		
<b>Total</b>	1615.917	47			

**Tabla 14: Modelo lineal**

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M.</b>	<b>F-cal</b>	<b>p-Valor</b>	<b>Significancia</b>
-------------	-------------	------------	-------------	--------------	----------------	----------------------

<b>Bloques</b>	11	1868.722	169.884	7.26	0.00001	***
<b>Tiempo</b>	2	1650.097	825.049	35.25	0.00001	***
<b>Tratamiento</b>	3	198.5	66.167	2.83	0.041	*
<b>Tratamiento*tiempo</b>	6	20.125	3.354	0.14	0.990	NS
<b>Error</b>	132	3089.5	23.405			
<b>Total</b>	143	4958.22	34.673			

GL = grados de libertad

SC= suma de cuadrados

CM= cuadrado medio

F= estadístico de prueba

P= estadístico de significancia

Significancia: \* p=0.05-0.01, \*\*p=0.01-0.001, \*\*\*p=0.001-0.0001

**Tabla 15: Comparación múltiple entre los diferentes medios de cultivo utilizando el método Sidak-Bonferroni.**

**45 DIAS**

		<i>p-valor</i>
<b>WP vs WP+ANA 0.05</b>	-1.333	1
<b>WP vs MS</b>	-1.416	1
<b>WP vs MS1/2</b>	-3.5	0.016
<b>WP+ANA 0.05 vs MS</b>	-0.083	1
<b>WP+ANA 0.05 vs MS1/2</b>	-2.166	0.334
<b>MS vs MS1/2</b>	-2.083	0.392

**90 DIAS**

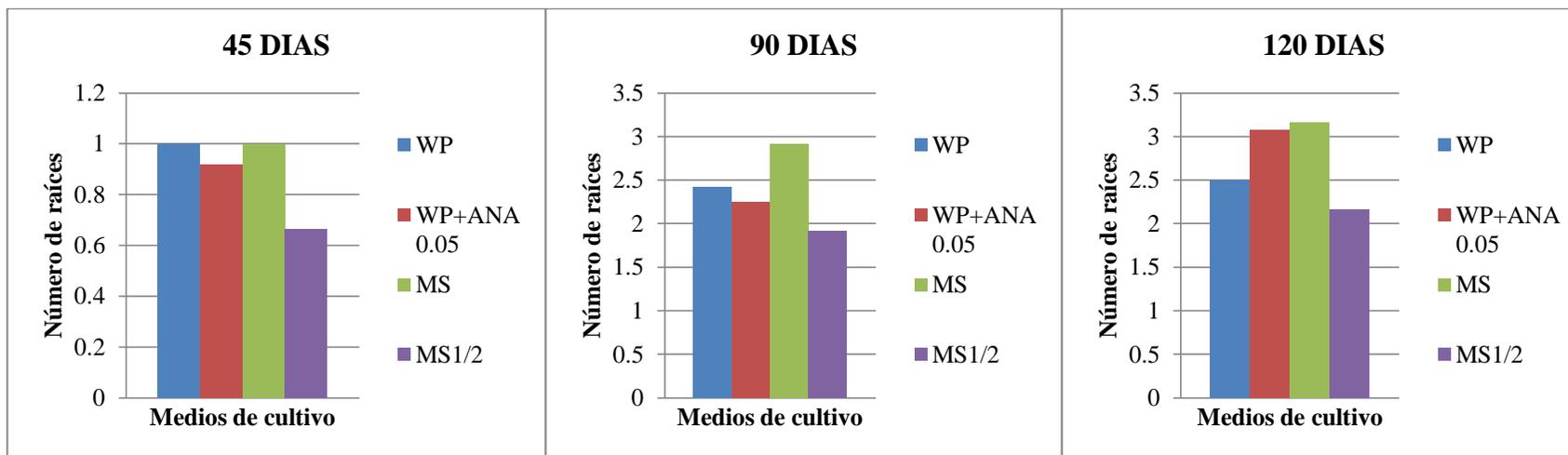
		<i>p-valor</i>
<b>WP vs WP+ANA 0.05</b>	-1.917	1
<b>WP vs MS</b>	-1.917	1
<b>WP vs MS1/2</b>	-3.583	0.528
<b>WP+ANA 0.05 vs MS</b>	0	1
<b>WP+ANA 0.05 vs MS1/2</b>	-1.667	1
<b>MS vs MS1/2</b>	-1.667	1

**120 DIAS**

		<i>p-valor</i>
<b>WP vs WP+ANA 0.05</b>	5	1
<b>WP vs MS</b>	-0.917	1
<b>WP vs MS1/2</b>	-2.583	1
<b>WP+ANA 0.05 vs MS</b>	-1.42	1
<b>WP+ANA 0.05 vs MS1/2</b>	-3.083	1
<b>MS vs MS1/2</b>	-1.667	1

## NÚMERO DE RAÍCES

**Tabla 16: Gráfico de barras del número de raíces**



**Tabla 17: Datos descriptivos**

45 DIAS					90 DIAS					120 DIAS				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
WP	12	24.2	2.017	0.396	WP	12	29	2.417	0.992	WP	12	30	2.500	1.182
WP+ANA 0.05	12	22.1	1.842	0.668	WP+ANA 0.05	12	27	2.250	1.114	WP+ANA 0.05	12	37	3.083	1.902
MS	12	18.2	1.517	0.151	MS	12	35	2.917	0.992	MS	12	35	2.917	0.992
MS1/2	12	13.6	1.133	0.242	MS1/2	12	23	1.917	1.538	MS1/2	12	23	1.917	1.538

**Tabla 18: Análisis de varianza**

**45 DIAS**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	5.446	3	1.815	4.983	0.005
<b>Dentro de los grupos</b>	16.029	44	0.364		
<b>Total</b>	21.475	47			

**90 DIAS**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	6.25	3	2.083	1.797	0.162
<b>Dentro de los grupos</b>	51	44	1.159		
<b>Total</b>	57.25	47			

**120 DIAS**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	9.729	3	3.243	2.311	0.089
<b>Dentro de los grupos</b>	61.750	44	1.403		
<b>Total</b>	71.479	47			

**Tabla 19: Modelo lineal**

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M.</b>	<b>F-cal</b>	<b>p-Valor</b>	<b>Significancia</b>
<b>Bloques</b>	11	106.1667	9.651515	11.19	0.00001	***
<b>Tiempo</b>	2	90.79167	45.39583	52.64	0.00001	***
<b>Tratamiento</b>	3	11.22222	3.740741	4.34	0.006	**
<b>Tratamiento*tiempo</b>	6	4.152778	0.69213	0.8	0.570	NS
<b>Error</b>	132	113.8333	0.862374			
<b>Total</b>						

GL = grados de libertad

SC= suma de cuadrados

CM= cuadrado medio

F= estadístico de prueba

P= estadístico de significancia

Significancia: \* p=0.05-0.01, \*\*p=0.01-0.001, \*\*\*p=0.001-0.0001

**Tabla 20: Comparación múltiple entre los diferentes medios de cultivo utilizando el método Sidak-Bonferroni.**

**45 DIAS**

		<i>p-valor</i>
<b>WP vs WP+ANA 0.05</b>	-0.0833	1
<b>WP vs MS</b>	0	1
<b>WP vs MS1/2</b>	-0.333	0.039
<b>WP+ANA 0.05 vs MS</b>	0.083	1
<b>WP+ANA 0.05 vs MS1/2</b>	-0.25	0.225
<b>MS vs MS1/2</b>	-0.333	0.039

**90 DIAS**

		<i>p-valor</i>
<b>WP vs WP+ANA 0.05</b>	-0.167	1
<b>WP vs MS</b>	0.5	1
<b>WP vs MS1/2</b>	-0.5	1
<b>WP+ANA 0.05 vs MS</b>	0.667	0.819
<b>WP+ANA 0.05 vs MS1/2</b>	-0.33	1
<b>MS vs MS1/2</b>	-1	0.167

**120 DIAS**

		<i>p-valor</i>
<b>WP vs WP+ANA 0.05</b>	0.583	1
<b>WP vs MS</b>	0.667	0.998
<b>WP vs MS1/2</b>	-0.333	1
<b>WP+ANA 0.05 vs MS</b>	0.083	1
<b>WP+ANA 0.05 vs MS1/2</b>	-0.917	0.357
<b>MS vs MS1/2</b>	-1	0.243

Anexo 2: Tablas y gráficos estadísticos de la etapa de micropropagación

LONGITUD DE TALLO

Tabla 21: Gráfico de barras de la longitud de tallo

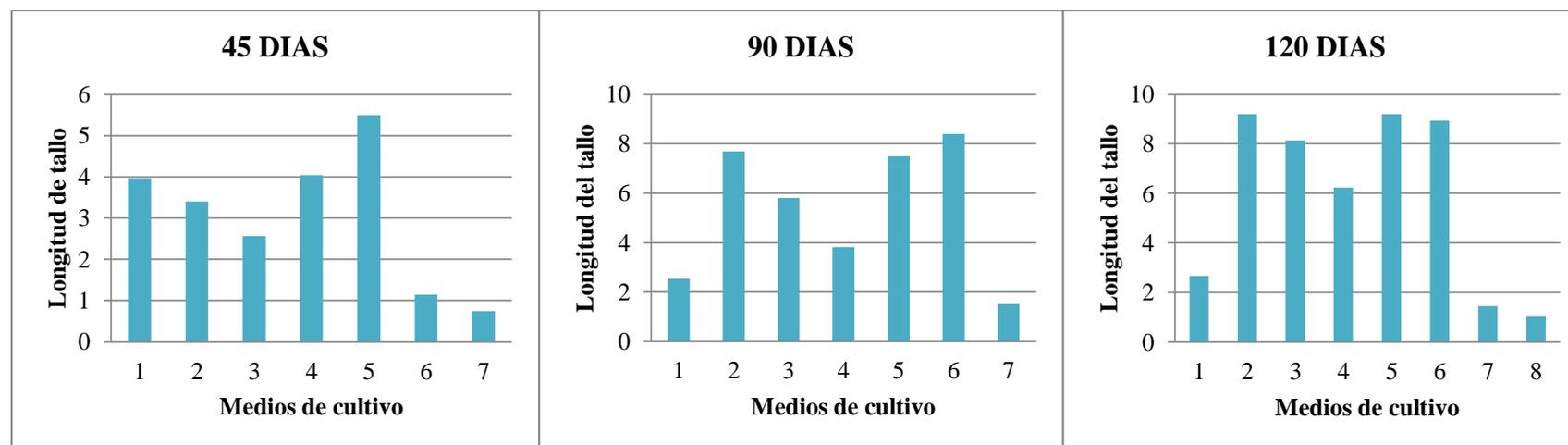


Tabla 22: Datos descriptivos

45 DIAS					90 DIAS					120 DIAS				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
M1	12	23.7	1.975	0.291	M1	12	30.5	2.542	0.366	M1	12	32.1	2.675	0.571
M2	12	47.6	3.967	2.028	M2	12	92.3	7.692	3.083	M2	12	110.4	9.200	3.44E-30
M3	12	40.9	3.408	1.368	M3	12	69.8	5.817	2.711	M3	12	97.7	8.142	4.090
M4	12	30.8	2.567	1.010	M4	12	45.8	3.817	3.023	M4	12	74.8	6.233	8.748
M5	12	48.5	4.042	2.004	M5	12	89.8	7.483	4.331	M5	12	110.4	9.200	0.000
M6	12	65.9	5.492	8.099	M6	12	100.7	8.392	2.157	M6	12	107.2	8.933	0.853
M7	12	13.7	1.142	0.099	M7	12	18.2	1.517	0.123	M7	12	17.4	1.450	0.163
M8	12	8.9	0.742	0.204	M8	12	11.7	0.975	0.511	M8	12	12.4	1.033	0.477

**Tabla 23: Análisis de varianza**

**45 DIAS**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	217.572	7	31.082	16.463	1.09E-13
<b>Dentro de los grupos</b>	166.142	88	1.888		
<b>Total</b>	383.713	95			

**90 DIAS**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	731.642	7	104.520	51.282	2.20E-28
<b>Dentro de los grupos</b>	179.357	88	2.038		
<b>Total</b>	910.998	95			

**120 DIAS**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	1079.892	7	154.270	82.819	5.68E-36
<b>Dentro de los grupos</b>	163.922	88	1.863		
<b>Total</b>	1243.813	95			

**Tabla 24: Modelo lineal**

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M.</b>	<b>F-cal</b>	<b>p-Valor</b>	<b>Significancia</b>
<b>Bloques</b>	23	2454.286	106.708	55.3	0.0001	***
<b>Tiempo</b>	2	425.181	212.590	110.17	0.0001	***
<b>Tratamiento</b>	7	1809.659	258.523	133.98	0.0001	***
<b>Tratamiento*tiempo</b>	14	219.446	15.675	8.12	0.0001	***
<b>Error</b>	264	509.420	1.930			
<b>Total</b>	287	2963.706	10.327			

GL = grados de libertad

SC = suma de cuadrados

CM = cuadrado medio

F = estadístico de prueba

P = estadístico de significancia

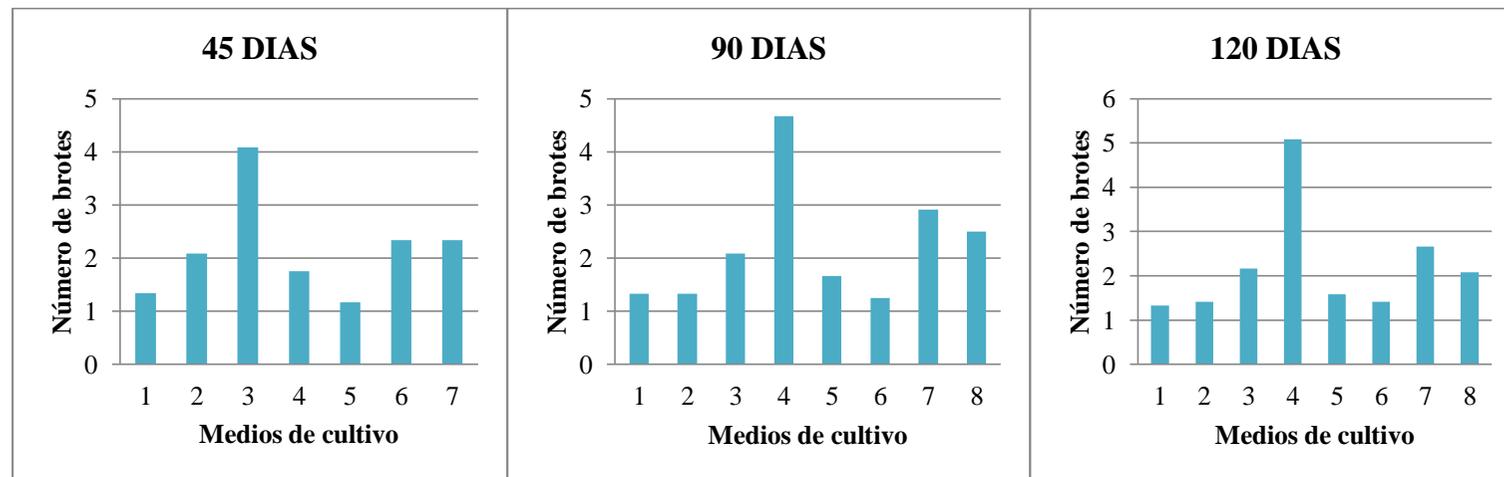
Significancia: \* p=0.05-0.01, \*\*p=0.01-0.001, \*\*\*p=0.001-0.0001

**Tabla 25: Comparación múltiple entre las diferentes medios de cultivo utilizando el método Sidak-Bonferroni**

45 DIAS			90 DIAS			120 DIAS		
		<i>p-valor</i>			<i>p-valor</i>			<i>p-valor</i>
M1 vs M2	1.992	0.017	M1 vs M2	5.15	0.0001	M1 vs M2	6.525	0.0001
M1 vs M3	1.433	0.345	M1 vs M3	3.275	0.0001	M1 vs M3	5.467	0.0001
M1 vs M4	0.592	1	M1 vs M4	1.275	0.878	M1 vs M4	3.558	0.0001
M1 vs M5	2.067	0.011	M1 vs M5	4.942	0.0001	M1 vs M5	6.525	0.0001
M1 vs M6	3.517	0.0001	M1 vs M6	5.85	0.0001	M1 vs M6	6.258	0.0001
M1 vs M7	-0.833	1	M1 vs M7	-1.025	1	M1 vs M7	-1.225	0.855
M1 vs M8	-1.233	0.855	M1 vs M8	-1.567	0.241	M1 vs M8	-1.642	0.115
M2vs M3	-0.558	1	M2vs M3	-1.875	0.051	M2vs M3	-1.058	1
M2vs M4	-1.4	0.404	M2vs M4	-3.875	0.0001	M2vs M4	-2.967	0.0001
M2vs M5	0.075	1	M2vs M5	-0.208	1	M2vs M5	0	1
M2vs M6	1.525	0.221	M2vs M6	0.7	1	M2vs M6	-0.267	1
M2vs M7	-2.825	0.0001	M2vs M7	-6.175	0.0001	M2vs M7	-7.75	0.0001
M2vs M8	-3.225	0.0001	M2vs M8	-6.717	0.0001	M2vs M8	-8.167	0.0001
M3vs M4	-0.842	1	M3vs M4	-2	0.026	M3vs M4	-1.908	0.026
M3vs M5	0.633	1	M3vs M5	1.667	0.148	M3vs M5	1.0583	1
M3vs M6	2.083	0.01	M3vs M6	2.575	0.001	M3vs M6	0.792	1
M3vs M7	-2.267	0.003	M3vs M7	-4.3	0.001	M3vs M7	-6.692	0.0001
M3vs M8	-2.667	0.0001	M3vs M8	-4.842	0.0001	M3vs M8	-7.108	0.0001
M4vs M5	1.475	0.283	M4vs M5	3.667	0.0001	M4vs M5	2.967	0.0001
M4vs M6	2.925	0.0001	M4vs M6	4.575	0.0001	M4vs M6	2.7	0.0001
M4vs M7	-1.425	0.359	M4vs M7	-2.3	0.004	M4vs M7	-4.783	0.0001
M4vs M8	-1.825	0.045	M4vs M8	-2.842	0.0001	M4vs M8	-5.2	0.0001
M5vs M6	1.45	0.319	M5vs M6	0.908	1	M5vs M6	-0.267	1
M5vs M7	-2.9	0.0001	M5vs M7	-5.967	0.0001	M5vs M7	-7.75	0.0001
M5vs M8	-3.3	0.0001	M5vs M8	-6.508	0.0001	M5vs M8	-8.167	0.0001
M6vs M7	-4.35	0.0001	M6vs M7	-6.875	0.0001	M6vs M7	-7.483	0.0001
M6vs M8	-4.75	0.0001	M6vs M8	-7.417	0.0001	M6vs M8	-7.9	0.0001
M7vs M8	-0.4	1	M7vs M8	-0.542	1	M7vs M8	-0.417	1

## NÚMERO DE BROTES

**Tabla 26: Gráfico de barras del número de brotes**



**Tabla 27: Datos descriptivos**

45 DIAS					90 DIAS					120 DIAS				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
M1	12	16	1.333	0.242	M1	12	16	1.333	0.242	M1	12	16	1.333	0.242
M2	12	16	1.333	0.242	M2	12	16	1.333	0.242	M2	12	17	1.417	0.265
M3	12	25	2.083	0.629	M3	12	25	2.083	0.811	M3	12	26	2.167	1.424
M4	12	49	4.083	4.811	M4	12	56	4.667	7.879	M4	12	61	5.083	9.356
M5	12	21	1.750	0.568	M5	12	20	1.667	0.424	M5	12	19	1.583	0.265
M6	12	14	1.167	0.152	M6	12	15	1.250	0.205	M6	12	17	1.417	0.447
M7	12	28	2.333	0.606	M7	12	35	2.917	2.083	M7	12	32	2.667	0.606
M8	12	28	2.333	1.697	M8	12	30	2.500	2.091	M8	12	25	2.083	1.720

**Tabla 28: Análisis de varianza**

**45 DIAS**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	74.323	7	10.618	9.494	9.90E-09
<b>Dentro de los grupos</b>	98.417	88	1.118		
<b>Total</b>	172.740	95			

**90 DIAS**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	112.656	7	16.0938	9.211	1.67E-08
<b>Dentro de los grupos</b>	153.750	88	1.74716		
<b>Total</b>	266.406	95			

**120 DIAS**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	130.823	7	18.689	10.437	1.78E-09
<b>Dentro de los grupos</b>	157.583	88	1.791		
<b>Total</b>	288.406	95			

**Tabla 29: Modelo lineal**

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M.</b>	<b>F-cal</b>	<b>p-Valor</b>	<b>Significancia</b>
<b>Bloques</b>	23	319.579861	13.8947766	8.95	0.0001	***
<b>Tiempo</b>	2	1.77777778	0.888888889	0.57	0.5647	NS
<b>tratamiento</b>	7	309.746528	44.249504	28.51	0.0001	**
<b>Tratamiento*tiempo</b>	14	8.05555556	0.575396825	0.37	0.9819	NS
<b>Error</b>	264	409.75	1.55208333			
<b>Total</b>	287	729.329861	2.54121903			

GL = grados de libertad

SC = suma de cuadrados

CM = cuadrado medio

F = estadístico de prueba

P = estadístico de significancia

Significancia: \* p=0.05-0.01, \*\*p=0.01-0.001, \*\*\*p=0.001-0.0001

**Tabla 30: Comparación múltiple entre las diferentes medios de cultivo utilizando el método Sidak-Bonferroni**

**45 DIAS**

		<i>p-valor</i>
M1 vs M2	0	1
M1 vs M3	0.75	1
M1 vs M4	2.75	0.0001
M1 vs M5	0.417	1
M1 vs M6	-0.167	1
M1 vs M7	1	0.640
M1 vs M8	1	0.64
M2vs M3	0.75	1
M2vs M4	2.75	0.0001
M2vs M5	0.417	1
M2vs M6	-0.167	1
M2vs M7	1	0.64
M2vs M8	1	0.64
M3vs M4	2	0.0001
M3vs M5	-0.333	1
M3vs M6	-0.917	1
M3vs M7	0.25	1
M3vs M8	0.25	1
M4vs M5	-2.333	0.0001
M4vs M6	-2.917	0.0001
M4vs M7	-1.75	0.003
M4vs M8	-1.75	0.003
M5vs M6	-0.583	1
M5vs M7	0.583	1
M5vs M8	0.583	1
M6vs M7	1.167	0.231
M6vs M8	1.167	0.231
M7vs M8	0	1

**90 DIAS**

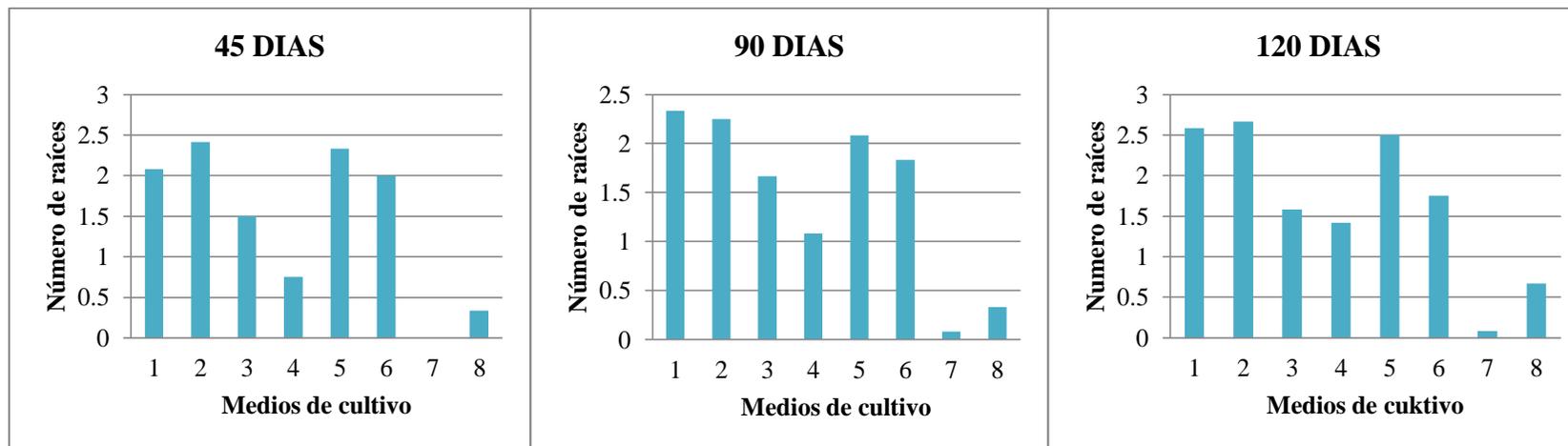
		<i>p-valor</i>
M1 vs M2	0	1
M1 vs M3	0.75	1
M1 vs M4	3.33333	0.0001
M1 vs M5	0.33333	1
M1 vs M6	-0.08333	1
M1 vs M7	1.58333	0.119
M1 vs M8	1.16667	0.933
M2vs M3	0.75	1
M2vs M4	3.333	0.0001
M2vs M5	0.333	1
M2vs M6	-0.083	1
M2vs M7	1.583	0.119
M2vs M8	1.167	0.933
M3vs M4	2.583	0.0001
M3vs M5	-0.417	1
M3vs M6	-0.833	1
M3vs M7	0.833	1
M3vs M8	0.417	1
M4vs M5	-3	0.0001
M4vs M6	-3.417	0.0001
M4vs M7	-1.75	0.047
M4vs M8	-2.167	0.003
M5vs M6	-0.417	1
M5vs M7	1.25	0.64
M5vs M8	0.833	1
M6vs M7	1.667	0.075
M6vs M8	1.25	0.64
M7vs M8	-0.417	1

**120 DIAS**

		<i>p-valor</i>
M1 vs M2	0.083	1
M1 vs M3	0.833	1
M1 vs M4	3.75	0.0001
M1 vs M5	0.25	1
M1 vs M6	0.083	1
M1 vs M7	1.333	0.467
M1 vs M8	0.75	1
M2vs M3	0.75	1
M2vs M4	3.667	0.0001
M2vs M5	0.167	1
M2vs M6	0	1
M2vs M7	1.25	0.687
M2vs M8	0.667	1
M3vs M4	2.917	0.0001
M3vs M5	-0.583	1
M3vs M6	-0.75	1
M3vs M7	0.5	1
M3vs M8	-0.083	1
M4vs M5	-3.5	0.0001
M4vs M6	-3.667	0.0001
M4vs M7	-2.417	0.001
M4vs M8	-3	0.0001
M5vs M6	-0.167	1
M5vs M7	1.083	1
M5vs M8	0.5	1
M6vs M7	1.25	0.687
M6vs M8	0.667	1
M7vs M8	-0.583	1

## NÚMERO DE RAICES

**Tabla 31: Gráficos de barras**



**Tabla 32: Datos descriptivos**

45 DIAS					90 DIAS					120 DIAS				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
M1	12	25	2.083	0.811	M1	12	28	2.333	1.152	M1	12	31	2.583	1.356
M2	12	29	2.417	2.992	M2	12	27	2.250	2.932	M2	12	32	2.667	2.788
M3	12	18	1.500	0.636	M3	12	20	1.667	0.606	M3	12	19	1.583	0.629
M4	12	9	0.750	0.568	M4	12	13	1.083	1.174	M4	12	17	1.417	1.720
M5	12	28	2.333	1.152	M5	12	25	2.083	1.174	M5	12	30	2.500	1.000
M6	12	24	2.000	1.818	M6	12	22	1.833	0.879	M6	12	21	1.750	0.568
M7	12	0	0.000	0.000	M7	12	1	0.083	0.083	M7	12	1	0.083	0.083
M8	12	4	0.333	0.242	M8	12	4	0.333	0.242	M8	12	8	0.667	0.788

**Tabla 33: Análisis de varianza**

**45 DIAS**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	75.073	7	10.725	10.438	1.78E-09
<b>Dentro de los grupos</b>	90.417	88	1.027		
<b>Total</b>	165.490	95			

**90 DIAS**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	63.167	7	9.024	8.758	3.94E-08
<b>Dentro de los grupos</b>	90.667	88	1.030		
<b>Total</b>	153.833	95			

**120 DIAS**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	73.406	7	10.487	9.393	1.19E-08
<b>Dentro de los grupos</b>	98.250	88	1.116		
<b>Total</b>	171.656	95			

**Tabla 34: Modelo lineal**

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M.</b>	<b>F-cal</b>	<b>p-Valor</b>	<b>Significancia</b>
<b>Bloques</b>	23	214.611	9.331	8.82	0.0001	***
<b>Tiempo</b>	2	2.965	1.483	1.4	0.2481	NS
<b>tratamiento</b>	7	206.833	29.548	27.93	0.0001	***
<b>Tratamiento*tiempo</b>	14	4.813	0.344	0.32	0.9905	NS
<b>Error</b>	264	279.333	1.058			
<b>Total</b>	287	493.944	1.721			

GL = grados de libertad

SC = suma de cuadrados

CM = cuadrado medio

F = estadístico de prueba

P = estadístico de significancia

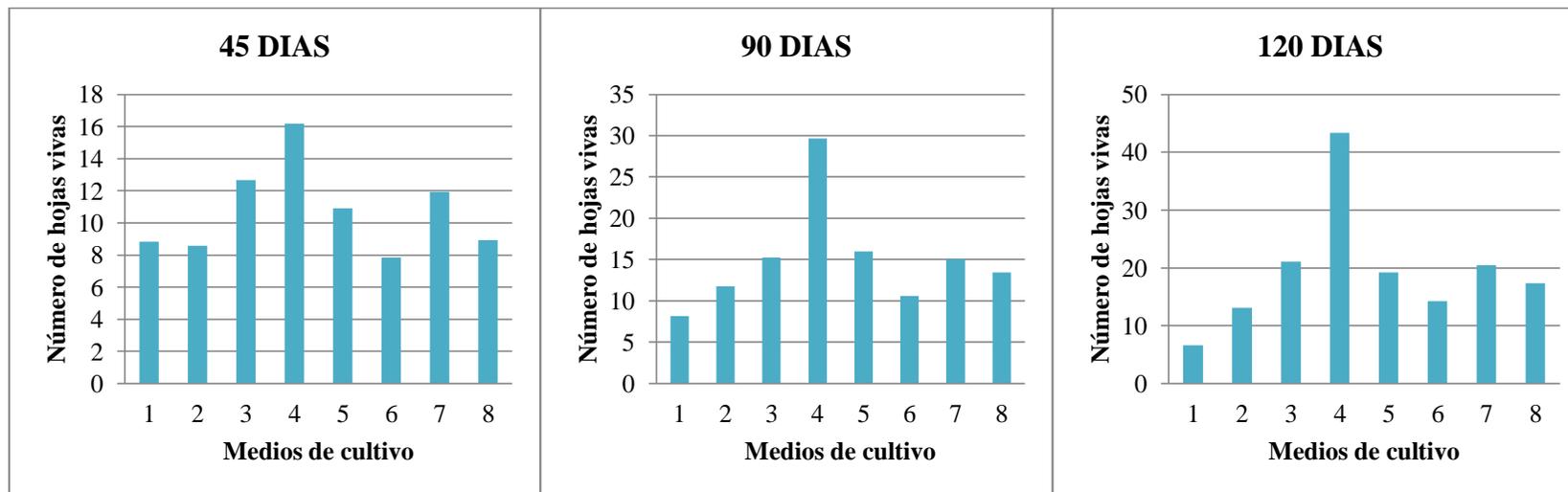
Significancia: \* p=0.05-0.01, \*\*p=0.01-0.001, \*\*\*p=0.001-0.0001

**Tabla 35: Comparación múltiple entre las diferentes medios de cultivo utilizando el método Sidak-Bonferroni**

45 DIAS			90 DIAS			120 DIAS		
		<i>p-valor</i>			<i>p-valor</i>			<i>p-valor</i>
M1 vs M2	0.333333	1	M1 vs M2	-0.083333	1	M1 vs M2	0.083	1
M1 vs M3	-0.583333	1	M1 vs M3	-0.666667	1	M1 vs M3	-1	0.637
M1 vs M4	-1.333333	0.05	M1 vs M4	-1.25	0.094	M1 vs M4	-1.167	0.230
M1 vs M5	0.25	1	M1 vs M5	-0.25	1	M1 vs M5	-0.083	1
M1 vs M6	-0.083333	1	M1 vs M6	-0.5	1	M1 vs M6	-0.833	1
M1 vs M7	-2.08333	0.0001	M1 vs M7	-2.25	0.0001	M1 vs M7	-2.5	0.0001
M1 vs M8	-1.75	0.002	M1 vs M8	-2	0.0001	M1 vs M8	-1.917	0.001
M2vs M3	-0.917	0.821	M2vs M3	-0.583333	1	M2vs M3	-1.083	0.388
M2vs M4	-1.667	0.003	M2vs M4	-1.16667	0.168	M2vs M4	-1.25	0.133
M2vs M5	-0.083	1	M2vs M5	-0.166667	1	M2vs M5	-0.167	1
M2vs M6	-0.417	1	M2vs M6	-0.416667	1	M2vs M6	-0.917	1
M2vs M7	-2.417	0.0001	M2vs M7	-2.16667	0.0001	M2vs M7	-2.583	0.0001
M2vs M8	-2.083	0.0001	M2vs M8	-1.91667	0.0001	M2vs M8	-2	0.0001
M3vs M4	-0.75	1	M3vs M4	-0.583	1	M3vs M4	-0.167	1
M3vs M5	0.833	1	M3vs M5	0.417	1	M3vs M5	0.917	1
M3vs M6	0.5	1	M3vs M6	0.167	1	M3vs M6	0.167	1
M3vs M7	-1.5	0.014	M3vs M7	-1.583	0.007	M3vs M7	-1.5	0.022
M3vs M8	-1.167	0.166	M3vs M8	-1.333	0.051	M3vs M8	-0.917	1
M4vs M5	1.583	0.007	M4vs M5	1	0.501	M4vs M5	1.083	0.388
M4vs M6	1.25	0.092	M4vs M6	0.75	1	M4vs M6	0.333	1
M4vs M7	-0.75	1	M4vs M7	-1	0.501	M4vs M7	-1.333	0.075
M4vs M8	-0.417	1	M4vs M8	-0.75	1	M4vs M8	-0.75	1
M5vs M6	-0.333	1	M5vs M6	-0.25	1	M5vs M6	-0.75	1
M5vs M7	-2.333	0.0001	M5vs M7	-2	0.0001	M5vs M7	-2.417	0.0001
M5vs M8	-2	0.0001	M5vs M8	-1.75	0.002	M5vs M8	-1.833	0.001
M6vs M7	-2	0.0001	M6vs M7	-1.75	0.002	M6vs M7	-1.667	0.006
M6vs M8	-1.667	0.003	M6vs M8	-1.5	0.014	M6vs M8	-1.083	0.388
M7vs M8	0.333	1	M7vs M8	0.25	1	M7vs M8	0.583	1

## NÚMERO DE HOJAS VIVAS

**Tabla 36: Gráfico de barras del número de hojas vivas**



**Tabla 37: Datos descriptivos**

45 DÍAS					90 DÍAS					120 DÍAS				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
M1	12	106	8.833	4.152	M1	12	98	8.167	6.333	M1	12	79	6.583	4.265
M2	12	103	8.583	5.902	M2	12	141	11.750	10.205	M2	12	157	13.083	9.174
M3	12	152	12.667	22.970	M3	12	183	15.250	31.114	M3	12	253	21.083	83.538
M4	12	194	16.167	70.152	M4	12	356	29.667	273.879	M4	12	520	43.333	959.333
M5	12	131	10.917	17.174	M5	12	192	16.000	28.182	M5	12	230	19.167	56.152
M6	12	94	7.833	10.697	M6	12	127	10.583	24.447	M6	12	171	14.250	14.386
M7	12	143	11.917	16.083	M7	12	181	15.083	57.720	M7	12	245	20.417	99.538
M8	12	107	8.917	33.174	M8	12	161	13.417	84.811	M8	12	208	17.333	118.061

**Tabla 38: Análisis de varianza**

**45 DIAS**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	655.625	7	93.661	4.15570228	5.41E-04
<b>Dentro de los grupos</b>	1983.33333	88	22.538		
<b>Total</b>	2638.95833	95			

**90 DIAS**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	3545.40625	7	506.487	7.842	2.32E-07
<b>Dentro de los grupos</b>	5683.58333	88	64.586		
<b>Total</b>	9228.98958	95			

**120 DIAS**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	9740.240	7	1391.463	8.280	9.87E-08
<b>Dentro de los grupos</b>	14788.917	88	168.056		
<b>Total</b>	24529.156	95			

**Tabla 39: Modelo lineal**

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M.</b>	<b>F-cal</b>	<b>p-Valor</b>	<b>Significancia</b>
<b>Bloques</b>	23	17555.6667	763.289855	8.97	0.0001	***
<b>Tiempo</b>	2	3614.39583	1807.19792	21.25	0.0001	***
<b>tratamiento</b>	7	10987.9444	1569.70635	18.45	0.0001	***
<b>Tratamiento*tiempo</b>	14	2953.32639	210.951885	2.48	0.0026	**
<b>Error</b>	264	22455.8333	85.0599747			
<b>Total</b>	287	40011.5	139.412892			

GL = grados de libertad

SC = suma de cuadrados

CM = cuadrado medio

F = estadístico de prueba

P = estadístico de significancia

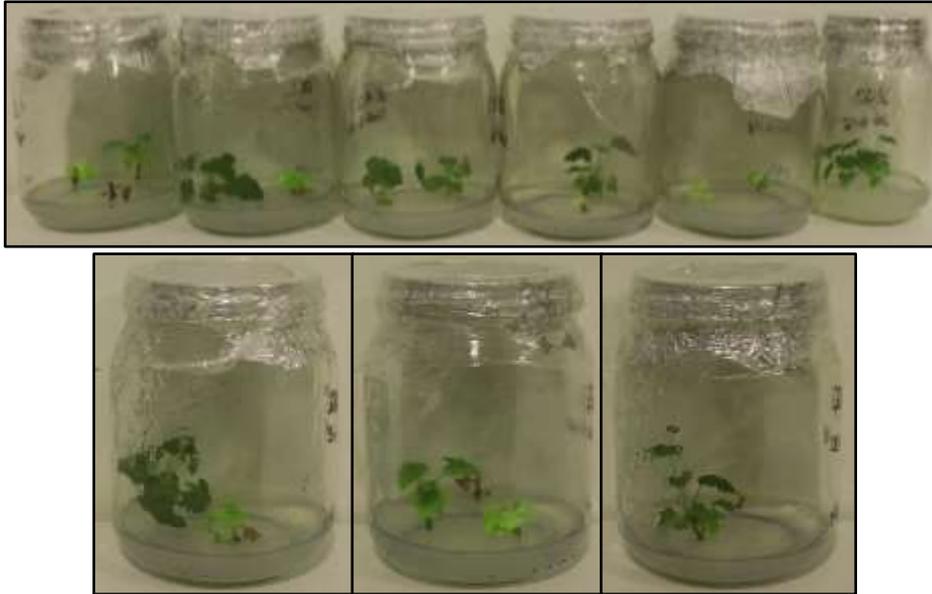
Significancia: \* p=0.05-0.01, \*\*p=0.01-0.001, \*\*\*p=0.001-0.0001

**Tabla 40: Comparación múltiple entre las diferentes medios de cultivo utilizando el método Sidak-Bonferroni**

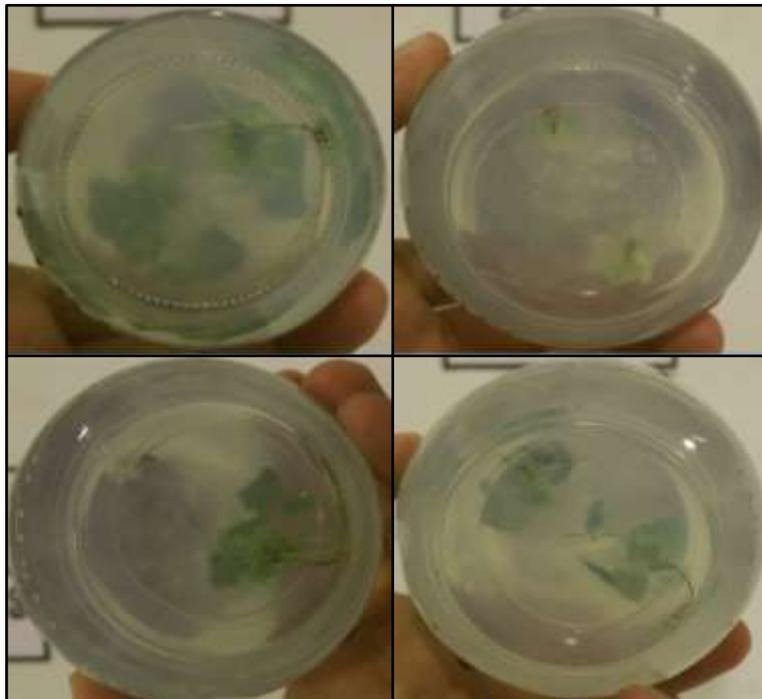
45 DIAS			90 DIAS			120 DIAS		
		<i>p-valor</i>			<i>p-valor</i>			<i>p-valor</i>
M1 vs M2	-0.25	1	M1 vs M2	3.583	1	M1 vs M2	6.5	1
M1 vs M3	3.833	1	M1 vs M3	7.083	0.94	M1 vs M3	14.5	0.208
M1 vs M4	7.333	0.008	M1 vs M4	21.5	0.0001	M1 vs M4	36.75	0.0001
M1 vs M5	2.083	1	M1 vs M5	7.833	0.535	M1 vs M5	12.583	0.549
M1 vs M6	-1	1	M1 vs M6	2.417	1	M1 vs M6	7.667	1
M1 vs M7	3.083	1	M1 vs M7	6.917	1	M1 vs M7	13.833	0.295
M1 vs M8	0.083	1	M1 vs M8	5.25	1	M1 vs M8	10.75	1
M2vs M3	4.083	1	M2vs M3	3.5	1	M2vs M3	8	1
M2vs M4	7.583	0.005	M2vs M4	17.917	0.0001	M2vs M4	30.25	0.0001
M2vs M5	2.333	1	M2vs M5	4.25	1	M2vs M5	6.083	1
M2vs M6	-0.75	1	M2vs M6	-1.167	1	M2vs M6	1.167	1
M2vs M7	3.333	1	M2vs M7	3.333	1	M2vs M7	7.333	1
M2vs M8	3.333	1	M2vs M8	1.667	1	M2vs M8	4.25	1
M3vs M4	3.5	1	M3vs M4	14.417	0.001	M3vs M4	22.25	0.002
M3vs M5	-1.75	1	M3vs M5	0.75	1	M3vs M5	-1.917	1
M3vs M6	-4.833	0.406	M3vs M6	-4.667	1	M3vs M6	-6.833	1
M3vs M7	-0.75	1	M3vs M7	-0.167	1	M3vs M7	-0.667	1
M3vs M8	-3.75	1	M3vs M8	-1.833	1	M3vs M8	-3.75	1
M4vs M5	-5.25	0.227	M4vs M5	-13.667	0.002	M4vs M5	-24.167	0.0001
M4vs M6	-8.333	0.001	M4vs M6	-19.083	0.0001	M4vs M6	-29.083	0.0001
M4vs M7	-4.25	0.867	M4vs M7	-14.583	0.001	M4vs M7	-22.917	0.001
M4vs M8	-7.25	0.009	M4vs M8	-16.25	0.0001	M4vs M8	-26	0.0001
M5vs M6	-3.083	1	M5vs M6	-5.417	1	M5vs M6	-4.917	1
M5vs M7	1	1	M5vs M7	-0.917	1	M5vs M7	1.25	1
M5vs M8	-2	1	M5vs M8	-2.583	1	M5vs M8	-1.833	1
M6vs M7	4.083	1	M6vs M7	4.5	1	M6vs M7	6.167	1
M6vs M8	1.083	1	M6vs M8	2.833	1	M6vs M8	3.083	1
M7vs M8	-3	1	M7vs M8	-1.667	1	M7vs M8	-3.083	1

### Anexo 3: Fotografías de la Etapa de establecimiento

A LOS 45 DÍAS



*Figura 11: Plántulas a los 45 días de ser sembradas en medio MS 1/2.*



*Figura 12: Raíces de las plántulas a los 45 días.*



**Figura 13:** Plántulas a los 45 días de ser sembradas en medio MS.



**Figura 14:** Raíces de las plántulas a los 45 días.



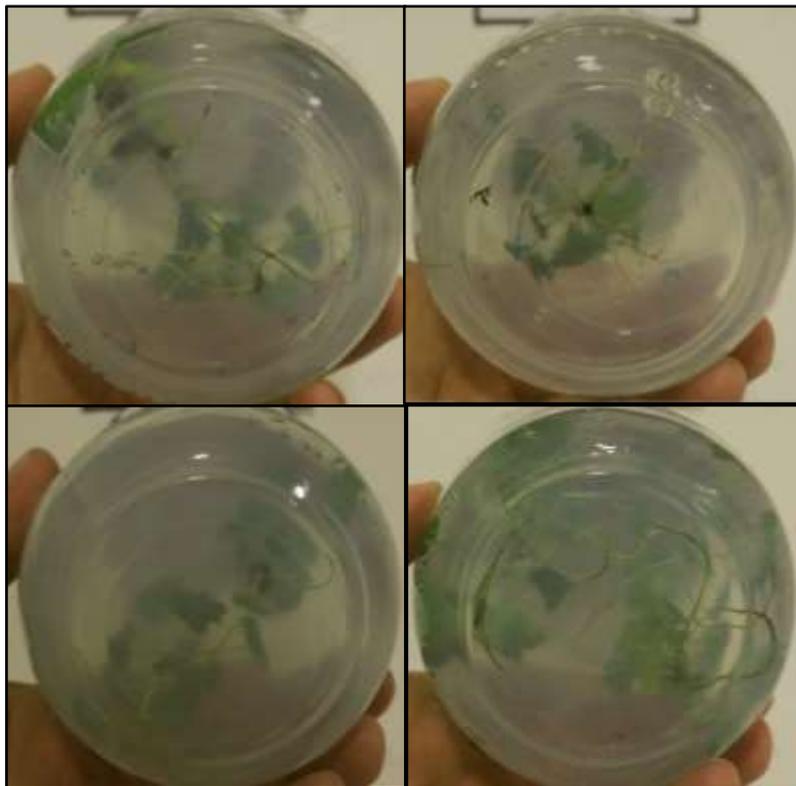
**Figura 15:** Plántulas a los 45 días de ser sembradas en medio WP.



**Figura 16:** Raíces de las plántulas a los 45 días.



**Figura 17:** Plántulas a los 45 días de ser sembradas en medio WP+ANA 0.05 ppm.



**Figura 18:** Raíces de las plántulas a los 45 días.

## A LOS 90 DÍAS



**Figura 19:** Plántulas a los 45 días de ser sembradas en medio MS1/2.



**Figura 20:** Raíces de las plántulas a los 90 días.



**Figura 21:** Plántulas a los 45 días de ser sembradas en medio MS.



**Figura 22:** Raíces de las plántulas a los 90 días.



**Figura 23:** Plántulas a los 90 días de ser sembradas en medio WP.



**Figura 24:** Raíces de las plántulas a los 90 días.



**Figura 25:** Plántulas a los 90 días de ser sembradas en medio WP+ANA 0.5 ppm.



**Figura 26:** Raíces de las plántulas a los 90 días.

A los 120 días



*Figura 27:* Plántulas a los 120 días de ser sembradas en medio MS1/2.



*Figura 28:* Plántulas a los 120 días de ser sembradas en medio MS.



**Figura 29:** Plántulas a los 120 días de ser sembradas en medio WP.

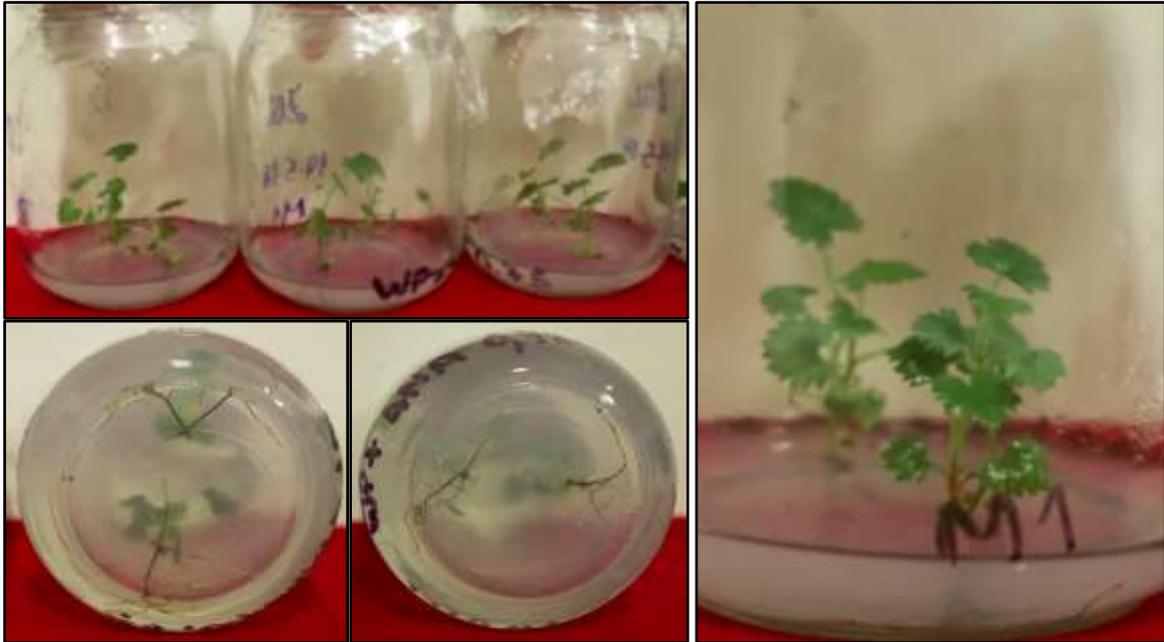


**Figura 30:** Plántulas a los 120 días de ser sembradas en medio WP+ANA 0.05 ppm.

## Anexo 4: Fotografías de la Etapa de micropropagación

A LOS 45 DÍAS

T1



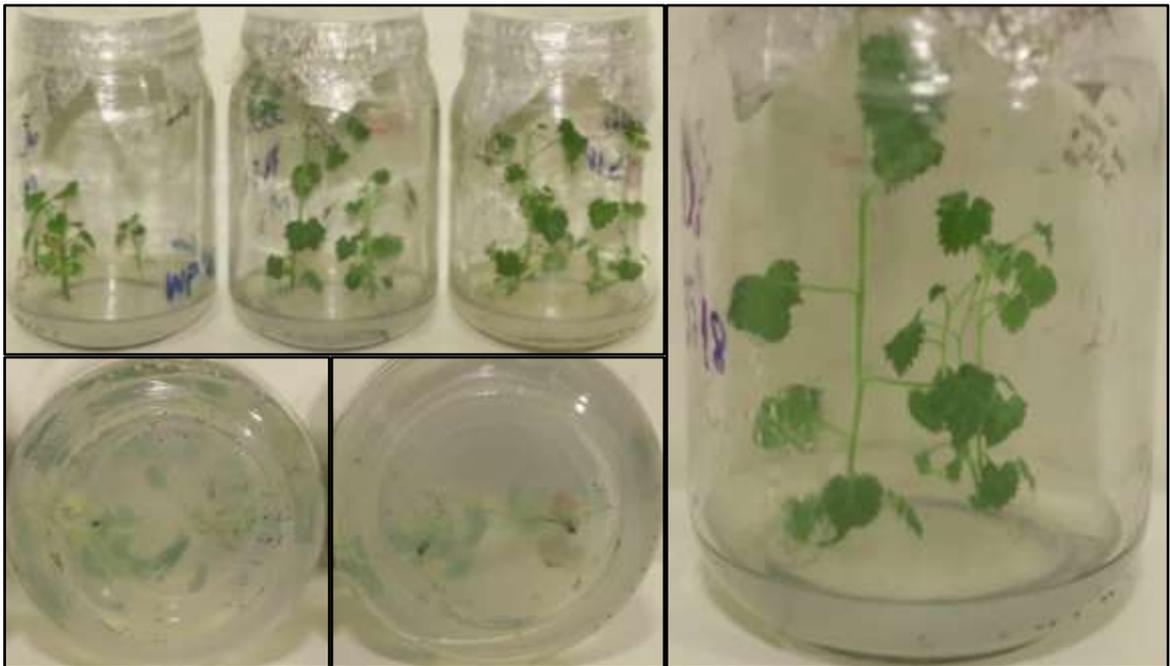
*Figura 31: ANA 0.75 ppm a los 45 días*

T2



*Figura 32: IBA 0.5 ppm a los 45 días*

T3



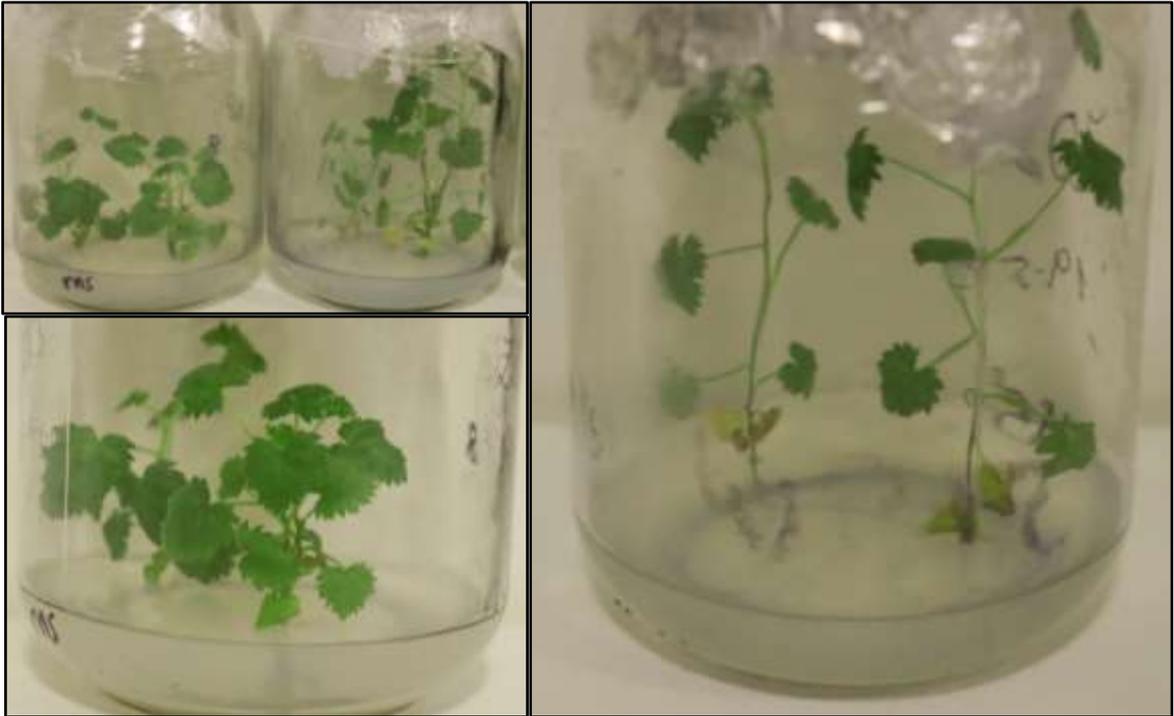
*Figura 33: GA3 1.0 ppm a los 45 días*

T4



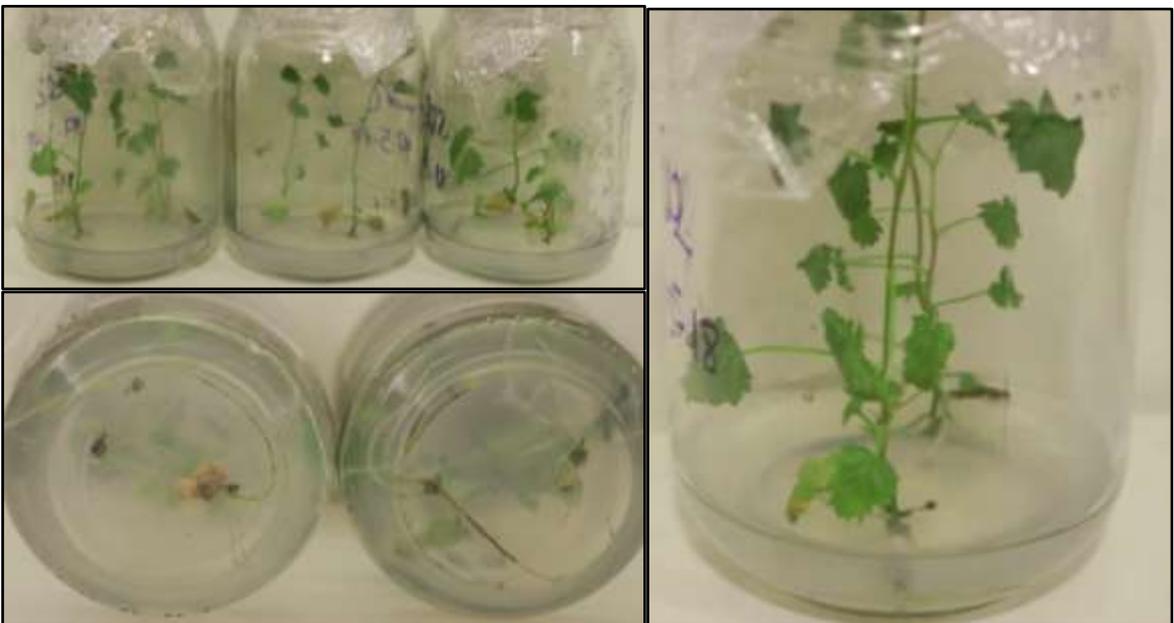
*Figura 34: BAP 1.0 ppm+GA3 0.5 ppm a los 45 días*

T5



*Figura 35: ANA 0.75 ppm + GA3 1.0 ppm a los 45 días*

T6



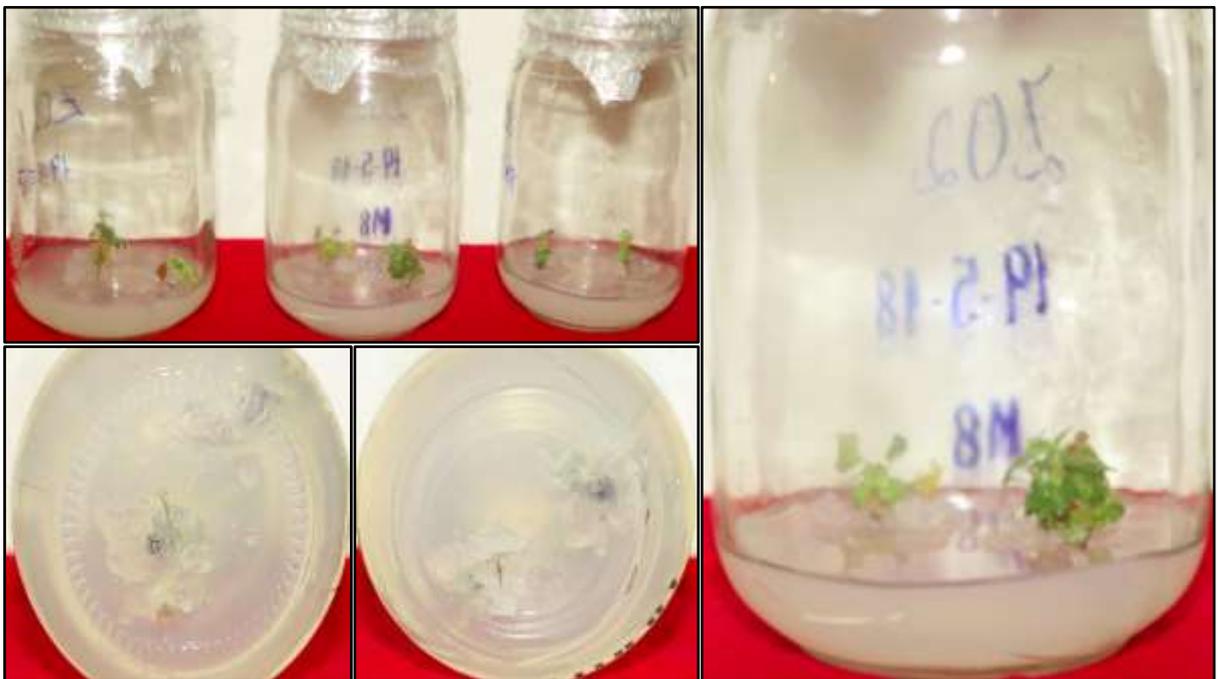
*Figura 36: IBA 0.5 ppm + GA3 1.0 ppm a los 45 días*

T7



**Figura 37: BAP 2.0 ppm + ANA 0.1 ppm + GA3 0.2 ppm a los 45 días**

T8



**Figura 38: BAP 1.0 ppm + IBA 0.1 ppm + GA3 0.1 ppm a los 45 días**

A los 90 días

T1



*Figura 39: ANA 0.75 ppm a los 90 días*

T2



*Figura 40: IBA 0.5 ppm a los 90 días*

T3



*Figura 41: GA3 1.0 ppm a los 90 días*

T4



*Figura 42: BAP 1.0 ppm + GA3 0.5 ppm a los 90 días*

T5



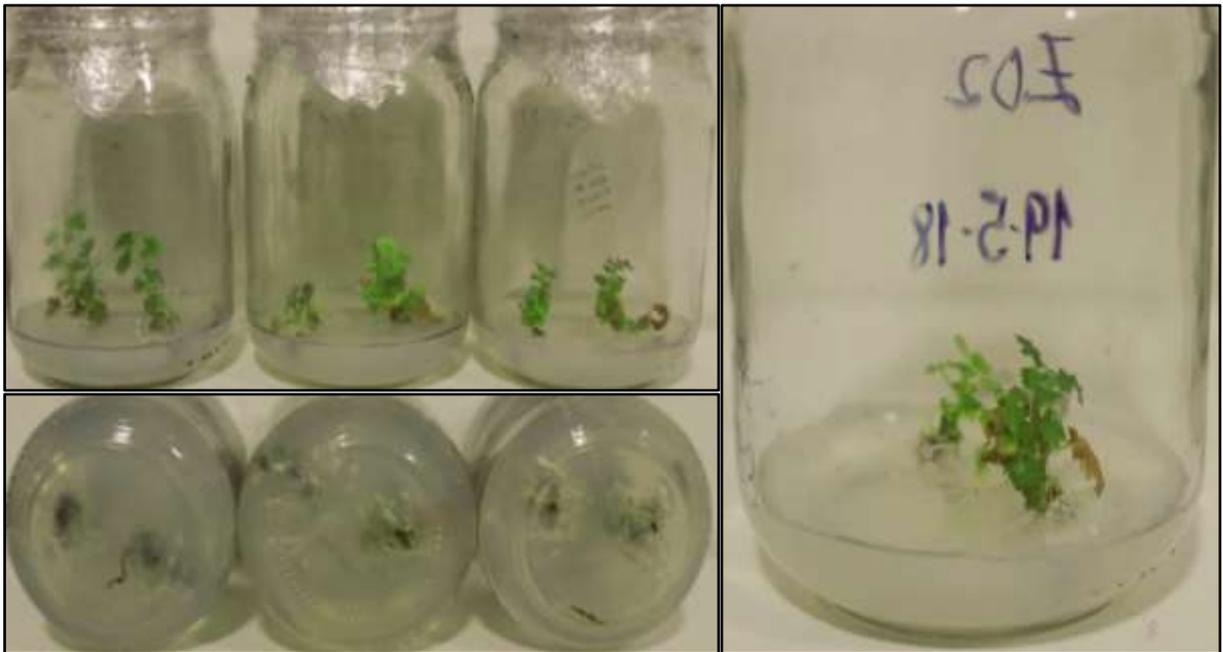
*Figura 43: ANA 0.75 ppm + GA3 1.0 ppm a los 90 días*

T6



*Figura 44: IBA 0.5 ppm + GA3 1.0 ppm a los 90 días*

T7



**Figura 45: BAP 2.0 ppm + ANA 0.1 ppm + GA3 0.2 ppm a los 90 días**

T8



**Figura 46: BAP 1.0 ppm + IBA 0.1 ppm + GA3 0.1 ppm a los 90 días**

A los 120 días

T1



*Figura 47: ANA 0.75 ppm a los 120 días*

T2



*Figura 48: IBA 0.5 ppm a los 120 días*

T3



*Figura 49: GA3 1.0 ppm a los 120 días*

T4



*Figura 50: BAP 1.0 ppm + GA3 0.5 ppm a los 120 días*

T5



*Figura 51: ANA 0.75 ppm + GA3 1.0 ppm a los 120 días*

T6



*Figura 52: IBA 0.5 ppm + GA3 1.0 ppm a los 120 días*

T7



*Figura 53: BAP 2.0 ppm + ANA 0.1 ppm + GA3 0.2 ppm a los 120 días*

T8



*Figura 54: BAP 1.0 ppm + IBA 0.1 ppm + GA3 0.1 ppm a los 120 días*