

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Estandarización de un medio de cultivo para  
la propagación clonal *in vitro* de *Rubus  
idaeus* var. Heritage “frambuesa roja” de  
importancia comercial**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en  
Biología

Jackelin Jarumi Allcaco Cuya

Lima, Perú

2016

## *DEDICATORIA*

A Dios, Jesús y María Madre por su amor incondicional, y mostrarme la vida como una oportunidad de construir la civilización del amor.

A mis padres, Aurora y Jorge, por su amor, apoyo, consejos, esperanza, confianza y fe.

A mi hermana Lucy, Efrain y ahijados Diego y Santiago, por llenarme de amor y sonrisas.

A los tesisistas del laboratorio de Biotecnología Vegetal, por creer, soñar y hacer realidad sus tesis.

# AGRADECIMIENTOS

- A mis padres, Jorge Allccaco y María Cuya,

    Mi profundo agradecimiento por su apoyo, paciencia, ánimo, fortaleza, oración y amor constante a lo largo de mi vida.

- Al Fondo de Investigación y Desarrollo para la Competitividad (FIDECOM) y a la empresa BODEGA SOTELO SAC,

    Mi sincero agradecimiento por la oportunidad de realizar esta investigación como parte del proyecto financiado “Adaptación de dos variedades de frambuesa *Rubus idaeus* (Heritage y Meeker) caracterizadas en la región Ica”.

- Al Ph D. Mauro Quiñones Aguilar, Jefe del Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Vegetal de la Universidad Ricardo Palma,

    Mi sincero agradecimiento por su apoyo, recomendaciones y asesoría durante el desarrollo de esta tesis.

- Al Mg. César Puicón Montero, Docente de Bioestadística,

    Mi sincero agradecimiento por sus aciertos, consejos y apoyo en la estadística de la presente tesis.

- A mi jurado de tesis, Dra. Haydee Montoya Terreros, Lic. Mercedes Gonzales de la Cruz y Lic. Flor de María Madrid de Mejía,

    Mi sincero agradecimiento por sus consejos y aciertos en el desarrollo de la tesis.

- A mi hermana, María Allccaco, a Efrain y mis ahijados,

    Mi profundo agradecimiento por sus consejos, amor, alegría, sonrisas y ánimo.

- A mi compañero Juan Carlos Altuna,

    Mi profundo agradecimiento por su apoyo, amor, oración y paciencia.

- A mis amigas Delia Castro, Milagros Teruya, Mary Elena Merino y Jossimar Vicente,

    Mi sincero agradecimiento por su amistad, apoyo, consejos, ánimos, alegría y fortaleza.

- A los practicantes y tesistas del Laboratorio de Biotecnología Vegetal,

    Mi agradecimiento por su apoyo en el proyecto de frambuesa.

- A mis hermanos de Encuentro de Promoción Juvenil San Gabino,

    Mi agradecimiento por su constante oración, y apoyo en la búsqueda de mi vocación integral.

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	3
ÍNDICE .....	5
ÍNDICE DE FIGURAS .....	8
ÍNDICE DE TABLAS .....	12
RESUMEN .....	14
ABSTRACT .....	15
I. INTRODUCCIÓN .....	16
II. ANTECEDENTES .....	18
2.1. Clasificación taxonómica.....	18
2.2. Origen y distribución geográfica .....	18
2.3. Descripción morfológica .....	20
2.4. Variedades .....	21
2.5. Propiedades nutraceuticas de la fruta.....	22
2.6. Importancia económica de frambuesa .....	23
2.7. Sistemas de propagación de frambuesa .....	25
2.8. Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i> .....	26
2.9. Medio de Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Rubus idaeus</i> L. ....	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	35
3.1. Obtención y manejo de plantas madre de frambuesa .....	35
3.2. Determinación del tiempo de exposición de explantes en dos sustancias desinfectantes en la esterilización .....	35
3.3. Determinación de la concentración de sales del medio de cultivo MS como medio de iniciación (MI) <i>in vitro</i> .....	37
3.4. Determinación de la concentración de citoquinina (6-BAP) y giberelina (AG <sub>3</sub> ) para multiplicación clonal <i>in vitro</i> .....	38
3.5. Determinación de la concentración de auxina (AIA) para enraizamiento de plántulas <i>in vitro</i> .....	39
3.6. Establecimiento del sistema de aclimatación de plántulas de <i>Rubus idaeus</i> L. ....	40

3.7.	Análisis estadístico .....	42
IV.	RESULTADOS .....	43
4.1.	Determinación del tiempo de exposición de explantes en dos sustancias desinfectantes en la esterilización .....	43
4.1.1.	Porcentaje de contaminación, fenolización y sobrevivencia de ápices meristemáticos .....	43
4.1.2.	Porcentaje de contaminación, fenolización y sobrevivencia de miniestacas .....	44
4.2.	Determinación de la concentración de sales del medio de cultivo MS como medio de iniciación (MI) <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos....	45
4.2.1.	Formación de brotes, número de hojas y porcentaje de color de hojas de ápices meristemáticos .....	45
4.3.	Determinación de la concentración de sales del medio de cultivo MS como medio de iniciación (MI) <i>in vitro</i> de miniestacas .....	46
4.3.1.	Formación y altura de brotes, número de hojas y porcentaje de color de hojas de miniestacas .....	46
4.4.	Determinación de la concentración de citoquinina (6-BAP) y giberelina (AG <sub>3</sub> ) para multiplicación clonal <i>in vitro</i> de segmentos apicales.....	47
4.4.1.	Número y altura de brotes .....	47
4.4.2.	Coeficiente de multiplicación (CM) y Tasa de velocidad de multiplicación (TVM) .....	48
4.5.	Determinación de la concentración de citoquinina (6-BAP) y giberelina (AG <sub>3</sub> ) para multiplicación clonal <i>in vitro</i> de miniestacas .....	48
4.5.1.	Número y altura de brotes .....	48
4.5.2.	Coeficiente de multiplicación y Tasa de velocidad de multiplicación (TVM) .....	49
4.6.	Determinación de la concentración de auxina (AIA) para enraizamiento de plántulas <i>in vitro</i> .....	49
4.6.1.	Porcentaje de enraizamiento .....	49
4.6.2.	Número y longitud de raíces .....	50

4.7. Establecimiento del sistema de aclimatación de plántulas de <i>Rubus idaeus</i> L. ....	51
4.7.1. Porcentaje de plántulas aclimatadas .....	51
4.7.2. Altura de plántulas aclimatadas .....	51
V. DISCUSIÓN.....	53
5.1. Determinación del tiempo de exposición de explantes en dos sustancias desinfectantes en la esterilización .....	53
5.2. Determinación de la concentración de sales del medio de cultivo MS como medio de iniciación (MI) <i>in vitro</i> .....	55
5.3. Determinación de la concentración de citoquinina (6-BAP) y giberelina (AG <sub>3</sub> ) para multiplicación clonal <i>in vitro</i> .....	56
5.4. Determinación de la concentración de auxina (AIA) para enraizamiento de plántulas <i>in vitro</i> .....	57
5.5. Establecimiento del sistema de aclimatación de plantas de <i>Rubus idaeus</i> L. ....	58
VI. CONCLUSIONES .....	60
VII. RECOMENDACIONES.....	61
9.1. Figuras.....	70
9.2. Tablas .....	107

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Planta de frambuesa <i>Rubus idaeus</i> L.</b>	70
<b>Figura 2. Producción de frambuesa de los 5 principales productores a nivel mundial entre 2013 al 2014.</b>	70
<b>Figura 3. Mapa de regiones del Perú con cultivos de frambuesa.</b>	71
<b>Figura 4. Esquema ilustrativo del meristemo apical y primordios foliares.</b>	71
<b>Figura 5. Sistema de propagación por cultivo de meristemos o yemas.</b>	72
<b>Figura 6. Plantas madre de frambuesa <i>Rubus idaeus</i> variedad Heritage en invernadero de la universidad Ricardo Palma</b>	72
<b>Figura 7. A. Yemas en etapa primocane. B. Vista de yema axilar</b>	73
<b>Figura 8. A y B. Miniestacas de 2 -3 cm de longitud con yema</b>	73
<b>Figura 9. Miniestacas desinfectadas.</b>	74
<b>Figura 10. A Vista de miniestaca. B y C. Aislamiento de ápices meristemáticos. D. Ápice meristemático con dos primordios foliares a 30x</b>	74
<b>Figura 11. Corte de tejido fenolizado en miniestaca (líneas rojas).</b>	75
<b>Figura 12. Explantes (ápices meristemático y miniestaca) in vitro</b>	75
<b>Figura 13. Plántulas in vitro de <i>Rubus idaeus</i> var. Heritage</b>	76
<b>Figura 14. Segmento apical para la multiplicación clonal</b>	76
<b>Figura 15. Miniestaca con yemas para la multiplicación clonal</b>	77
<b>Figura 16. Plántula in vitro entre 1 – 1.5 cm para el enraizamiento</b>	77
<b>Figura 17. A y B. Bandejas de PVC de 35 celdas con sustrato estéril</b>	78
<b>Figura 18. A y B. Plántulas enraizadas. C y D. Transferencia de plántulas en sustrato. E y F. Bandejas con plántulas establecidas en cámaras de aclimatación.</b>	78
<b>Figura 19. A y B. Plántulas aclimatadas en cámara de aclimatación. C y D. Evaluación del crecimiento de las plántulas. E y F. Transferencia de plántulas en bolsas con sustrato</b>	79
<b>Figura 20. Porcentaje (%) de fenolización de ápices meristemáticos según tratamientos de esterilización</b>	80
<b>Figura 21. Ápices meristemáticos: A. Necrosado (muerto) B. Vivo</b>	80
<b>Figura 22. Porcentaje (%) de sobrevivencia de ápices meristemáticos según tratamientos de esterilización</b>	81
<b>Figura 23. Porcentaje (%) de contaminación de miniestacas según tratamientos de esterilización</b>	81

<b>Figura 24. Miniestacas contaminadas: A. Por bacterias. B. Por hongos.</b>	<b>82</b>
<b>Figura 25. Porcentaje de fenolización (%) de miniestacas según tratamientos de la esterilización</b>	<b>82</b>
<b>Figura 26. A. Miniestaca fenolizada</b>	<b>83</b>
<b>Figura 27. Porcentaje de sobrevivencia (%) de miniestacas según tratamientos de esterilización</b>	<b>83</b>
<b>Figura 28. Ápices meristemáticos en desarrollo a diferente concentración de MS a los 30 días</b>	<b>84</b>
<b>Figura 29. Ápices meristemáticos con hojas desarrolladas a los 50 días.</b>	<b>84</b>
<b>Figura 30. Porcentaje (%) de ápices meristemáticos con hojas a diferente concentración de sales MS</b>	<b>85</b>
<b>Figura 31. Número de hojas de ápices meristemáticos a diferente concentración de sales MS</b>	<b>85</b>
<b>Figura 32. Porcentaje (%) de ápices meristemáticos por categorías de color de hojas según tratamientos a los 7 días.</b>	<b>86</b>
<b>Figura 33. Porcentaje (%) de ápices meristemáticos por categorías de color de hojas según tratamientos a los 14 días.</b>	<b>86</b>
<b>Figura 34. Porcentaje (%) de ápices meristemáticos por categorías de color de hojas según tratamientos a los 21 días.</b>	<b>87</b>
<b>Figura 35. Porcentaje (%) de ápices meristemáticos por categorías de color de hojas según tratamientos a los 30 días.</b>	<b>87</b>
<b>Figura 36. Porcentaje (%) de miniestacas con brotes según tratamientos para determinar la concentración de sales MS del medio de iniciación</b>	<b>88</b>
<b>Figura 37. Media de la altura de brote (cm) según tratamientos para determinar la concentración de sales MS del medio de iniciación a los 30 días.</b>	<b>88</b>
<b>Figura 38. Número de hojas de miniestacas a diferente concentración de sales MS</b>	<b>89</b>
<b>Figura 39. Porcentaje (%) de miniestacas por categorías de color de hojas según tratamientos a los 7 días.</b>	<b>89</b>
<b>Figura 40. Porcentaje (%) de miniestacas por categorías de color de hojas según tratamientos a los 14 días.</b>	<b>90</b>
<b>Figura 41. Porcentaje (%) de miniestacas por categorías de color de hojas según tratamientos a los 21 días.</b>	<b>90</b>
<b>Figura 42. Porcentaje (%) de miniestacas por categorías de color de hojas según tratamientos a los 30 días.</b>	<b>91</b>
<b>Figura 43. Brotes con hojas en miniestaca in vitro en MS a los 7 días</b>	<b>91</b>
<b>Figura 44. A y B. Brotes con hojas en miniestacas a los 14 días.</b>	<b>92</b>

<b>Figura 45. A y B. Brotes con hojas vitrificadas en miniestacas a los 14 días.</b>	<b>92</b>
<b>Figura 46. A y B. Brotes con hojas en miniestacas a los 21 días.</b>	<b>93</b>
<b>Figura 47. A y B. Brotes con hojas en miniestacas en medio con sales completa de MS a los 30 días.</b>	<b>93</b>
<b>Figura 48. Brotes con hojas en miniestacas en medio con 3/4 de sales MS a los 30 días. A. Verde claro. B. Amarillo.</b>	<b>93</b>
<b>Figura 49. Brotes con hojas en miniestacas en medio con 1/2 de sales MS a los 30 días. A. Verde. B. Yema sin desarrollo de brote.</b>	<b>94</b>
<b>Figura 50. Brotes con hojas en miniestacas en medio con 1/4 de sales MS a los 30 días. A. Verde claro. B. Yema sin desarrollo de brote.</b>	<b>94</b>
<b>Figura 51. Número de brotes según tratamiento en la multiplicación de segmentos apicales in vitro</b>	<b>95</b>
<b>Figura 52. Media de altura de brotes según tratamiento en la multiplicación de segmentos apicales in vitro</b>	<b>95</b>
<b>Figura 53. Desarrollo de brotes a partir de segmentos apicales según tratamiento de multiplicación</b>	<b>96</b>
<b>Figura 54. Coeficiente de multiplicación según tratamiento en la multiplicación de segmentos apicales in vitro</b>	<b>97</b>
<b>Figura 55. Tasa de velocidad de multiplicación según tratamiento en la multiplicación de segmentos apicales in vitro</b>	<b>97</b>
<b>Figura 56. Número de brotes según tratamiento en la multiplicación de miniestacas in vitro</b>	<b>98</b>
<b>Figura 57. Media de altura de brotes según tratamiento en la multiplicación de miniestacas in vitro</b>	<b>98</b>
<b>Figura 58. Desarrollo de brotes a partir miniestacas según tratamiento de multiplicación</b>	<b>99</b>
<b>Figura 59. Coeficiente de multiplicación según tratamiento en la multiplicación de miniestacas in vitro</b>	<b>100</b>
<b>Figura 60. Tasa de velocidad de multiplicación según tratamiento en la multiplicación de miniestacas in vitro</b>	<b>100</b>
<b>Figura 61. Porcentaje de enraizamiento a diferente concentración de auxina</b>	<b>101</b>
<b>Figura 62. Número de raíces a diferente concentración de auxina</b>	<b>101</b>
<b>Figura 63. Enraizamiento de plántulas in vitro según tratamiento</b>	<b>102</b>
<b>Figura 64. Media de la longitud de raíces a diferente concentración de auxina</b>	<b>103</b>
<b>Figura 65. Porcentaje de plántulas aclimatadas en diferente composición de sustrato</b>	<b>103</b>

<b>Figura 66. Media de la altura de plántulas (cm) según tratamientos para la aclimatación de plántulas</b>	<b>104</b>
<b>Figura 67. Plántulas en aclimatación a los 7 días. A. turba:arena 1:1 v/v. B. turba:arena 2:1 v/v. C. turba:arena:humus 1:1:1 v/v</b>	<b>104</b>
<b>Figura 68. Plántulas en aclimatación a los 14 días. A. turba:arena 1:1 v/v. B. turba:arena 2:1 v/v. C. turba:arena:humus 1:1:1 v/v</b>	<b>105</b>
<b>Figura 69. Plántulas aclimatadas a los 21 días. A. turba:arena 1:1 v/v. B. turba:arena 2:1 v/v. C. turba:arena:humus 1:1:1 v/v</b>	<b>105</b>
<b>Figura 70. Plántulas en aclimatación a los 30 días. A. turba:arena 1:1 v/v. B. turba:arena 2:1 v/v. C. turba:arena:humus 1:1:1 v/v</b>	<b>106</b>
<b>Figura 71. A – D Plantas de frambuesa adaptadas a condiciones de Ica. E – F Frutos y vino de frambuesa</b>	<b>106</b>

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Determinación del tiempo de exposición de explantes en dos sustancias desinfectantes en la esterilización</b>	107
<b>Tabla 2. Componentes del medio Murashige and Skoog. 1962 (MS)</b>	107
<b>Tabla 3. Criterio de evaluación de las variables porcentaje de contaminación, fenolización y sobrevivencia en la esterilización de explantes in vitro</b>	108
<b>Tabla 4. Determinación de la concentración de sales del medio Murashige and Skoog (MS) como medio de iniciación in vitro</b>	108
<b>Tabla 5. Criterio de evaluación de la variable formación de brotes en la determinación del medio de iniciación (MI) in vitro</b>	108
<b>Tabla 6. Determinación de la concentración de citoquinina (6BAP) y giberelina (AG3) para multiplicación clonal in vitro</b>	109
<b>Tabla 7. Determinación de la concentración de auxina (AIA) para enraizamiento de plántulas in vitro</b>	109
<b>Tabla 8. Estandarización del sistema de aclimatación de plantas de <i>Rubus idaeus</i> L.</b>	110
<b>Tabla 9. Número de ápices meristemáticos (%) contaminados y no contaminados según tratamientos de esterilización a los 30 días</b>	110
<b>Tabla 10. Número de ápices meristemáticos (%) fenolizados y no fenolizados según tratamientos de esterilización a los 30 días</b>	110
<b>Tabla 11. Test de probabilidad exacta de Fisher de la frecuencia de fenolización de ápices meristemáticos según tratamientos 3 y 4 a los 30 días.</b>	111
<b>Tabla 12. Número de ápices meristemáticos (%) vivos y muertos según tratamientos de esterilización a los 30 días</b>	111
<b>Tabla 13. Número de miniestacas (%) contaminados y no contaminados según tratamientos de esterilización a los 30 días</b>	111
<b>Tabla 14. Test de probabilidad exacta de Fisher de la frecuencia de contaminación de miniestacas según tratamientos 1 y 3 a los 30 días.</b>	112
<b>Tabla 15. Número de miniestacas (%) fenolizados y no fenolizados según tratamientos de esterilización a los 30 días</b>	112
<b>Tabla 16. Número de miniestacas (%) vivos y muertos según tratamientos de esterilización a los 30 días</b>	112
<b>Tabla 17. Número de miniestacas (%) con presencia y ausencia de brote según tratamientos de concentración de sales del medio de iniciación a los 30 días</b>	113

<b>Tabla 18. Test de probabilidad exacta de Fisher de formación de brote de miniestacas según tratamientos 1 y 2 de concentración de sales del medio de iniciación a los 30 días</b>	113
<b>Tabla 19. Media de la altura de brotes de miniestacas según tratamientos de concentración de sales del medio de iniciación a los 30 días</b>	113
<b>Tabla 20. ANOVA de un factor de la altura de brotes de miniestacas según tratamientos de concentración de sales del medio de iniciación a los 30 días</b>	114
<b>Tabla 21. Número de brotes según tratamientos en la multiplicación de plántulas en el primer ciclo durante 42 días</b>	114
<b>Tabla 22. Media del número de brotes por tratamiento en la multiplicación de plántulas en el primer ciclo hasta los 42 días</b>	115
<b>Tabla 23. Media de la altura de brotes por tratamiento en la multiplicación de plántulas en el primer ciclo hasta los 42 días</b>	116
<b>Tabla 24. Media del número de brotes por tratamiento en la multiplicación de miniestacas en el primer ciclo hasta los 42 días</b>	117
<b>Tabla 25. Media del número de brotes por tratamiento en la multiplicación de miniestacas en el primer ciclo hasta los 42 días</b>	118
<b>Tabla 26. Media de la altura de brotes por tratamiento en la multiplicación de miniestacas en el primer ciclo hasta los 42 días</b>	119
<b>Tabla 27. Número de raíces por tratamiento en el enraizamiento de plántulas durante 30 días</b>	120
<b>Tabla 28. Media del número de raíces por tratamiento en el enraizamiento de plántulas durante 30 días</b>	121
<b>Tabla 29. Media de longitud de raíces por tratamiento en el enraizamiento de plántulas durante 30 días</b>	122
<b>Tabla 30. Media de la altura de plántulas por tratamiento en la aclimatación durante 30 días</b>	123

## RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de estandarizar un medio de cultivo para la propagación clonal *in vitro* de *Rubus idaeus* L. variedad Heritage “frambuesa roja”, para lo cual se desarrollaron ensayos de establecimiento, multiplicación, enraizamiento *in vitro* y aclimatación. Las plantas madre de frambuesa se obtuvieron del vivero Los Inkas (Lima) y fueron mantenidas en condiciones de invernadero en la Universidad Ricardo Palma. Se tomaron miniestacas de 2 - 3 cm, se esterilizaron en condiciones asépticas y se sembraron ápices meristemáticos y miniestacas en medio Murashigue and Skoog (MS) a 1/4, 1/2, 3/4 y concentración completa de sales. Las plántulas obtenidas fueron multiplicadas en medio de cultivo con 1, 1.5, 3 mg/L de 6-bencilaminopurina (6-BAP), y en combinación con 0.5 y 1 mg/L de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>). Estas fueron enraizadas en medio con 0.5, 1, 2 mg/L de ácido indol acético (AIA) y 1mg/L de AIA con 0.5 mg/L de carbón activado. Las plántulas enraizadas fueron transferidas a cámaras de aclimatación en sustrato turba:arena:humus (1:1:0, 2:1:0 y 1:1:1 v/v). Los resultados muestran el desarrollo de brotes en un 80% a partir de miniestacas cultivadas en medio MS con sales completas con altura promedio de 1.088 cm. El medio de multiplicación suplementado con 1 mg/L de 6-BAP y 0.5 mg/L de GA<sub>3</sub>, permitió obtener 5.4 brotes / miniestaca. Asimismo, se logró obtener 70% de plántulas enraizadas en medio a mitad de concentración de sales suplementado con 1 mg/L de AIA y 100% de sobrevivencia de plántulas aclimatadas en sustrato turba:arena (1:1 y 2:1 v/v) utilizando cámaras de aclimatación.

Palabras clave: *Rubus idaeus*, *in vitro*, Murashigue and Skoog, 6-BAP, GA<sub>3</sub>, propagación clonal, enraizamiento, aclimatación.

## ABSTRACT

This research was conducted with the purpose to standardize a culture medium for *in vitro* clonal propagation of *Rubus idaeus* L. variety Heritage "red raspberry", for which assays of *in vitro* establishment, multiplication, rooting and acclimatization were developed. Raspberry mother plants were obtained from the plant nursery Los Inkas (Lima) and were kept in the greenhouse at the University Ricardo Palma. Nodal segments of 2 - 3 cm were taken, sterilized under aseptic conditions and shoot tips and nodal segments were cultured in 1/4, 1/2, 3/4 and full strength Murashigue and Skoog (MS) medium. Plantlets were multiplied in culture medium with 1, 1.5, 3 mg/L of 6-benzylaminopurine (6-BAP), and in combination with 0.5 and 1 mg/L of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>). These were rooted in medium with 0.5, 1, 2 mg/L of indole acetic acid (IAA) and 1 mg/L of IAA with 0.5 mg/L of activated charcoal. Rooted plantlets were transferred to acclimatization chambers in substrate peat:sand:humus ( 1:1:0, 2:1:0 and 1:1:1 v/v). The results show the development of shoots by 80% from nodal segments cultured in full strength MS medium with average height of 1.088 cm. The multiplication medium supplemented with 1 mg/L of 6-BAP and 0.5 mg/L GA<sub>3</sub>, allowed the growth of 5.4 shoots/explant. Also, 70% of rooted plantlets were obtained in half strength MS medium supplemented with 1 mg/L of IAA, and 100% of survival of acclimatized plantlets in peat:sand (1:1 and 2:1 v/v) using acclimatization chambers.

Keywords: *Rubus idaeus*, *in vitro*, Murashigue and Skoog, 6-BAP, GA<sub>3</sub>, clonal propagation, rooting, acclimatization.

# I. INTRODUCCIÓN

La frambuesa *Rubus idaeus* L., especie diploide ( $2n=2x=14$ ), es un arbusto perenne de la familia Rosácea, comúnmente denominada frambuesa roja, distribuida y cultivada en gran parte del mundo en Europa, norte de Asia, Norteamérica y América del Sur.

Los frutos son de sabor muy fino y agridulce, puede ser utilizada para consumo en fresco y en la industria alimentaria tales como: mermeladas, licores, jaleas, conservas, entre otros. Actualmente, existe gran demanda de esta fruta a nivel internacional por parte de empresas agroindustriales, debido a sus propiedades nutraceuticas principalmente como antioxidante, antiinflamatorio y anticancerígeno. A nivel nacional, la demanda local se enfoca en los supermercados, grandes restaurantes y pastelerías; sin embargo, la falta de cultivos en nuestro país no permite abastecer la demanda existente, aun cuando presenta pisos ecológicos y climas favorables para el cultivo de este frutal.

Convencionalmente con la finalidad de incrementar el número de plantas en campo, se emplea el sistema de propagación tradicional por hijuelos; sin embargo, el uso de este sistema no garantiza obtener plantas exentas de enfermedades, lo que incrementa el número de plantas enfermas de generación en generación causando bajo rendimiento en la productividad.

La biotecnología vegetal mediante el uso de la técnica de cultivo *in vitro* permite producir plantas libres de virus y multiplicar clonalmente especies de importancia económica con mejores características fenotípicas, lo que permite ampliar la frontera de cultivo.

A nivel mundial se han desarrollado numerosos protocolos de cultivo *in vitro* de frambuesa, sin embargo en nuestro país no existe un medio de

cultivo estandarizado para su propagación clonal, aun cuando en los últimos años existe gran interés socioeconómico por esta especie.

Por tal motivo, la presente investigación tiene como objetivo estandarizar el medio de cultivo *in vitro* para la propagación clonal de *Rubus idaeus* variedad Heritage “frambuesa roja” de importancia comercial, como una de las partes fundamentales del proyecto “Adaptación de dos variedades de frambuesa *Rubus idaeus* (Heritage y Meeker) caracterizadas en la región Ica” financiado por INNOVATE PERÚ - FIDECOM y llevado a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de la especie *Rubus idaeus* L. “frambuesa roja” (Figura 1) según el Sistema de Información de Biodiversidad (SIB) 2014 y USDA NRCS 2014 es:

Reino	:	Plantae
Subreino	:	Tracheobionta
Superdivisión	:	Spermatophyta
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Subclase	:	Rosidae
Orden	:	Rosales
Familia	:	Rosaceae
Género	:	<i>Rubus</i>
Especie	:	<i>Rubus idaeus</i> L.

El género *Rubus* es altamente heterocigoto con un amplio nivel de ploidía que van desde diploide a dodecaploide, asimismo existe hibridación entre especies y apomixis. Por estas razones Graham *et al.*, 2009 sostienen que los miembros de este género pueden ser difíciles de clasificar en especies distintas.

### 2.2. Origen y distribución geográfica

El género *Rubus* es el género de mayor número de especies dentro de la familia Rosaceae, estimado entre 700 y 750 especies distribuidas en 12 subgéneros a nivel mundial (Cancino-Escalante *et al.*, 2012), muchas de

ellas se cultivan por su fruto, mientras que otras son más de uso ornamental (Robles, 2009).

Este género fue identificado por primera vez por Carlos Von Linneo en el año 1753, en su publicación de *Species Plantarum*, adoptado por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica como el comienzo formal de la clasificación científica de plantas (Mora, 2011).

El género *Rubus* considera tres subgéneros como los más importantes, de acuerdo al número y relevancia de las especies agrupadas, siendo estos: *Rubus* (antes *Eubatus*), *Idaeobatus* y *Malachobatus* (Mora, 2011). Dentro de los subgéneros *Idaeobatus* y *Eubatus* están incluidas las frambuesas, moras, frutas árticas y frambuesas con flores, consideradas de gran importancia económica (Graham *et al.*, 2009).

De acuerdo a los estudios realizados por Robles, 2009 se menciona dos centros de origen para la frambuesa (*Rubus idaeus*), el primero de ellos es en el este de Asia de donde proviene el subgénero *Idaeobatus* que tiene 195 especies reconocidas, dentro de las cuales están las: frambuesas europeas (*R. idaeus* L. var. *vulgatus*), las frambuesas americanas *R. occidentalis* L. y *R. idaeus* L. var. *strigosus* (frambuesa roja) y otras. El segundo centro de origen considerado es en Norteamérica, del cual es originaria la frambuesa roja (*R. idaeus* L. var. *strigosus*) que no tiene subespecies identificadas debido a que presenta amplia variabilidad.

Con respecto a la distribución, se menciona que el subgénero *Idaeobatus* se encuentra principalmente en Asia, así como en el oriente y sur de África, Europa y América del Norte. Por el contrario, el subgénero *Rubus* (*Eubatus*) se distribuye principalmente en América del Sur, Europa y América del Norte. Los miembros de este subgénero se distinguen por la facilidad que tienen sus frutos maduros para separarse del receptáculo, lo cual favorece la cosecha rápida (Graham *et al.*, 2009). Por otra parte, el

subgénero *Malachobatus* se produce principalmente en el sureste de Asia, Japón, Malasia, Australia y Madagascar (Hummer, 1996).

*Rubus idaeus*, denominada frambuesa Europea de frutos generalmente rojos, es una especie diploide ( $2n=2x=14$ ) (Graham *et al.*, 2009). Esta especie crece espontáneamente en el antiguo continente y la leyenda dice que es originaria del monte Ida (Isla de Creta en Grecia) y del que Linneo adoptó su nombre específico (*idaeus*), encontrándose también en estado silvestre en el Asia menor (Robles, 2009).

Actualmente, la frambuesa se encuentra distribuida en gran parte del mundo, presentando una alta diversidad genética que genera diferencias principalmente en la forma de crecimiento de la planta, tolerancia a enfermedades, tiempo de madurez, resistencia a plagas y productividad (Morales, 2009). Se cultiva intensamente en algunos países de Europa, Norteamérica, y América del Sur (principalmente Chile) y en menor grado en Australia y Nueva Zelanda (Parodi, 2013).

### **2.3. Descripción morfológica**

La frambuesa *Rubus idaeus* L. es un arbusto perenne caracterizado por poseer un sistema radicular que se extiende a poca profundidad (en los primeros 30 cm), de desarrollo horizontal con abundante ramificaciones, caracterizándose por sus raíces primarias y secundarias leñosas. De estas raíces, brotan cada año gran número de nuevos tallos que sustituirán a los que están en producción y secarán a lo largo del verano (Carrera, 1974; Morales, 2009)

Los tallos son erectos cubiertos de pequeñas espinas, fuertes y abundantes según las variedades y pueden alcanzar 2.5 m de altura de acuerdo al clima y suelo. El periodo vegetativo de los tallos es bianual. Durante el primer año crecen y se desarrollan los brotes denominando a esta etapa de crecimiento como primocane, mientras que en el segundo

los tallos o cañas se lignifican, florecen y fructifican denominándose floricone, luego las cañas mueren en verano después de la maduración de las frutas. Algunas variedades, llamadas reflorecientes o remontantes, desarrollan el primer año los brotes fructíferos en la parte terminal de los tallos, produciendo una primera cosecha (según la variedad). Las yemas no desarrolladas lo hacen en la primavera siguiente, dando lugar a la segunda cosecha, tras lo cual se secan y mueren (Carrera, 1974).

Las hojas son compuestas, imparipinadas o ternadas, con 3 a 5 folíolos más o menos variables en tamaño y forma, siendo ovales, alargadas, acuminadas, aserradas, verdes por el haz y blanquecinas aterciopeladas por el envés (Robles, 2009), presentando un largo peciolo (Morales, 2009).

Las flores se encuentran en un cimo terminal sencillo; son pequeñas de color blanco verdosas, con un pedúnculo bastante largo y espinoso. Cáliz con cinco sépalos largos y persistentes; cinco pétalos caducos, estambres y pistilos numerosos, inscritos en un receptáculo convexo. Cada pistilo tiene un ovario con una celda que encierra un óvulo, del cual se desarrolla una pequeña drupa que a su vez tiene un pequeñísimo núcleo (Robles, 2009).

El fruto del frambueso es una polidrupa formado por muchas drupelas convexas, deprimidas, rugosas, aproximadas en piña y se dejan observar fácilmente. El color más común es el rojo o amarillento, pero existen variedades de frutos que son de color blanco y hasta negro. Asimismo, cada drupa tiene adherido un pelo de color amarillo oro (Robles, 2009).

## **2.4. Variedades**

Las variedades de frambueso difieren según las características de sus frutos, tiempo de madurez, forma de crecimiento de la planta, tolerancia a enfermedades, resistencia a plagas, objetivo de producción, entre otras;

sin embargo, en un contexto general se clasifican según su origen, color o época de producción, siendo estas dos últimas las más tradicionales formas de clasificación (Morales, 2009).

Las variedades del tipo *Rubus idaeus* L., es decir las frambuesas de color rojo, son cultivadas masivamente en Chile, destacando la variedad Heritage entre las remontantes, de la que se obtienen dos cosechas en la temporada, y las variedades Chilliwack y Meeker entre las no remontantes, que solo presentan una cosecha durante la temporada (Morales, 2009).

La variedad Heritage es la más cultivada en Chile (más del 80%), considerada una planta vigorosa de crecimiento erecto, con gran número de espinas. Es altamente productiva con fruta para consumo o congelado. Su fruto es de forma cónica, de tamaño mediano con peso promedio de 2.2 g, de color rojo brillante, de buena consistencia y dulzor, registrando 12.8° Brix y 2.2% de acidez. La fruta de la primera cosecha (noviembre-diciembre), es decir, de la producción de caña, es de menor calidad que la proveniente de hijuelo (cosecha en marzo – abril) (Morales, 2009). Asimismo, se caracteriza por su rusticidad y amplia adaptación a diferentes medio ambientes (San Martín, 2013).

## **2.5. Propiedades nutracéuticas de la fruta**

La frambuesa, fruta de presencia y aroma exquisito, con sabor muy fino y agridulce característico, puede ser utilizada para consumo en fresco y en la industria alimentaria tales como: mermeladas, jarabes, papillas infantiles, helados, yogurt, licores, jaleas, conservas (almíbar), golosinas, salsas, infusiones, entre otros (Carrera, 1974; Manzano, 2013).

El consumo de la frambuesa se ha incrementado a nivel mundial, debido principalmente a las propiedades nutracéuticas como: antioxidante, antiinflamatorio, reductor de peso e inhibidor del crecimiento de células de

cáncer, tales como tumores mamarios, orales, del colon, de próstata y de hígado (Weber *et al.*, 2001; Seeram *et al.*, 2006) Asimismo, se ha identificado la propiedad de suprimir lesiones hepáticas en ensayos realizados en ratas (Liu *et al.* 2010). Por otro lado, los estudios realizados por Morimoto *et al.*, 2005 sostienen que las cetonas de frambuesa previenen la obesidad y la acumulación de ácidos grasos en el hígado.

De acuerdo con Liu *et al.*, 2002, las frambuesas son ricas en sustancias fenólicas, en particular flavonoides y antocianinas, lo que da a las frambuesas el color característico. Los estudios de Weber *et al.*, 2001 sugieren que los fitoquímicos en las frambuesas tienen una significativa actividad antioxidante y anticancerígena. Está claro que las frambuesas con más altos compuestos fenólicos y flavonoides tienen mayor actividad antioxidante, pero no hay ninguna relación entre la actividad contra el cáncer y la cantidad total de compuestos fenólicos/flavonoides de esta fruta. La adición y función de sinérgica de los fitoquímicos pueden contribuir significativamente en la actividad antioxidante y en la capacidad de inhibir la proliferación de células tumorales.

## **2.6. Importancia económica de frambuesa**

Dentro de los principales mercados consumidores de frambuesa se encuentran países como, Alemania, Reino Unido, Francia (Unión Europea), en Norteamérica destaca principalmente Estados Unidos y Canadá, mientras que en Asia el Japón se convierte en uno de los referentes interesantes. Sin embargo, se ha encontrado que las perspectivas de mayor crecimiento para las exportaciones de frambuesas congeladas en los próximos años estarían orientadas hacia Australia, Corea del Sur, Taiwán, China, Hong Kong y la India (Parodi, 2013). Esta demanda está dada por las características nutricionales que la fruta de frambuesa brinda a los consumidores. De acuerdo a la información brindada por Araya, 2010, menciona que 100 g de frambuesa proporciona

1.3 g de proteínas, 4.81 g de carbohidratos, 0.3 g de lípidos, 4.68 g de fibra, vitamina A, B1, B2, B6, C y E, así como 40 mg de calcio, 1 mg de hierro, 44 mg de fósforo, 3 µg de yodo, entre otros.

Jones, 2006 afirma que el comercio internacional de frambuesas frescas es de aproximadamente 120 millones de dólares, siendo el principal importador de frambuesas Estados Unidos con el 30% del mercado, por su parte la Unión Europea y Canadá suman más del 60% de las compras mundiales.

Con respecto a la producción mundial de frambuesas, el país con mayor área cultivada de frambuesa es Rusia quien posee alrededor de 143,000 t de producción, seguido de Polonia con 121,040 t, Estados Unidos con 91,300 t y Serbia con 68,458 t (FAOSTAT, 2016) (Figura 2); además de Chile, primer productor de berries en el hemisferio sur, con volumen de producción de 61 t en el año 2011 siendo las variedades más cultivadas Heritage (81%), Meeker (15%) y Chilliwack (3%) (IRO 2014). Sin embargo a pesar que se menciona a Rusia como el primer productor de frambuesas esta cifra resulta siendo no oficial, ello en razón de que la International Raspberries Organization (IRO) no considera a este país dentro de las estadísticas de producción pues no genera un reporte oficial del total de frambuesa producida (Parodi, 2013).

Por otra parte la producción de frambuesa en Chile oscila entre 7000 y 14000 kg por hectárea según las variedades, sin embargo, los estudios realizados por Carrera, 1974 mencionan que a partir de la segunda cosecha (tercer año de la plantación), la producción puede llegar a los 18000 kg por hectárea en condiciones favorables.

Actualmente, en el Perú no se produce frambuesa a escala industrial, no obstante algunos productores del sector agroindustrial especialmente frutícola tienen parcelas pequeñas (hasta 3 ha.) de cultivo en la región Cajamarca, Arequipa, Lambayeque entre otros; es así que según Sierra exportadora, 2014 afirman que la producción nacional alcanza un

promedio de 5 t/ha en conjunto. Es importante indicar, que de acuerdo al estudio realizado por Ramírez, 2007 menciona que en el Perú existen condiciones adecuadas para promover el cultivo de frambuesa puesto que cuenta con pisos ecológicos y climas favorables que permiten obtener frutos de sabor, apariencia y tamaño superiores, factor que le otorga ventaja comparativa con respecto a otros países del hemisferio sur. Asimismo, menciona que la demanda local de esta fruta está concentrada en los supermercados, las cadenas de hoteles, los grandes restaurantes y pastelerías, enfocando su consumo a los sectores A y B.

Consecuentemente, a partir del 2011, ha surgido interés por cultivar frambuesas, es así que Sierra exportadora ha desarrollado un programa nacional denominado Perú Berries que busca identificar las zonas andinas con potencial para este cultivo estableciendo parcelas demostrativas de frambuesa en Lambayeque (Incahuasi y Cañaris), Cajamarca y Ancash (Parodi, 2013; Sierra exportadora, 2014) (Figura 3).

## **2.7. Sistemas de propagación de frambuesa**

La propagación de frambuesa, según Morales, 2009 y Robles, 2009, se realiza mediante diferentes sistemas, tales como: 1) sistema por hijuelos enraizados inician su desarrollo a comienzos de primavera, y son trasplantados directamente en un sustrato arenoso, rico en materia orgánica y previamente desinfectado. 2) sistema por estacas de raíz que permite obtener plantas enraizadas o brotes etiolados, el cual consiste en sembrar esquejes de raíces de 10 – 15 cm de largo y de 5 mm de diámetro previamente esterilizadas con cloro comercial (5%), en camas a fines de invierno. Los brotes con 3 – 4 hojas obtenidos a los 15 – 20 días son transferidos en bolsas con la misma mezcla para el enraizamiento y almacenados en condiciones de oscuridad para estimular la formación de raíces adventicias y obtener brotes etiolados. 3) sistema por cultivo *in vitro* permite obtener clonalmente plantas libres de patógenos (principalmente

virus) con características agronómicas deseadas, técnica que consiste en aislar los meristemos, sembrarlos en un medio de cultivo estéril, incubar en condiciones controladas y propagar clonalmente en cualquier época del año para cubrir la demanda de los agricultores.

## **2.8. Cultivo de tejidos vegetales *in vitro***

De acuerdo con la definición establecida por Roca *et al.*, 1991, el cultivo de tejidos *in vitro* es considerada como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (porción de tejido vegetal) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones controladas.

Los principios básicos del cultivo de tejidos vegetales fueron definidos a principios del siglo XX por Haberlandt (1902), quien enunció el concepto de la totipotencia, Hanning (1904), Küster (1909) y otros investigadores, pero quienes desarrollaron las bases en que se fundamentan los métodos actuales fueron White (1943, 1963) y Gautheret (1934, 1942) a mediados del siglo XX (Robles, 2009). Los primeros trabajos en este campo tuvieron, un éxito limitado debido a tres factores fundamentales: primero era el desconocimiento de los requerimientos nutricionales de los tejidos cultivados *in vitro*; segundo, era el uso frecuente de tejidos vegetales maduros para iniciar el cultivo y tercero fue el desconocimiento de la existencia y función de las fitohormonas o reguladores de crecimiento en el desarrollo vegetal. Estas sustancias eran desconocidas hasta 1928 cuando Went y Timan descubrieron el ácido indolacético (AIA), y en 1955 cuando Skoog descubrió la kinetina. En 1975, Skoog y Miller fueron los primeros que lograron la formación *in vitro* de brotes, raíces y tejido calloso mediante el uso de diferentes combinaciones de auxina y citoquinina, Otro de los pasos fundamentales para la consolidación de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales, lo dieron en 1962 Murashigue y Skoog al desarrollar un medio de cultivo (MS) que reunía las

características apropiadas para ser utilizado en el cultivo de una gran variedad de tejidos de diferentes especies vegetales (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

Para realizar el establecimiento de los cultivos Mroginski *et al.* 2010 menciona que es necesario tener en cuenta algunos aspectos generales relacionados con el explante, la asepsia, el medio de cultivo y las condiciones de incubación.

El explante es un órgano, tejido o fragmento de tejido, células, etc. aislado del material vegetal (planta madre) para iniciar el cultivo *in vitro*. La elección del explante adecuado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos, este varía de acuerdo al objetivo perseguido. En general los factores como el genotipo, edad de la planta y su estado fisiológico son importantes a considerar (Abdelnour- Esquivel *et al.*, 1994).

Levitus *et al.* 2010 refieren que uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer los cultivos *in vitro* es la contaminación con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus).

Por otro lado, un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición de los cultivos. Existen numerosas formulaciones de los medios los cuales comprende entre 6 y 40 compuestos que incluyen fuente de carbono, minerales, vitaminas, sustancias reguladoras del crecimiento, agente gelificante (en el caso de medios semisólidos) y otros compuestos (Levitus *et al.* 2010).

De acuerdo a las recomendaciones de Levitus *et al.* 2010; Roca *et al.*, 1991, la incubación de los cultivos se debe llevar a cabo en condiciones controladas: temperatura, calidad e intensidad de luz, fotoperíodo, humedad atmosférica e higiene, debido a que estos factores pueden

alterar las respuestas morfogénicas. En general, los cultivos son incubados a temperatura de 25-28 °C, con fotoperiodo de luz/oscuridad de 16/8 horas. La luz es generalmente provista por lámparas fluorescentes del tipo «luz día» con una irradiancia de entre 50 y 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . La humedad atmosférica debe ser elevada (80- 90%) (Levitus *et al.* 2010).

El cultivo de meristemas consiste en aislar el domo meristemático con dos primordios foliares (Figura 4) y sembrarlo en un medio de cultivo adecuado que posibilite el desarrollo de una planta completa. Las plantas provenientes de este cultivo son idénticas a la planta madre y conserva sus características agronómicas, por tanto, estas son usadas para la micropropagación, conservación de germoplasma y para la obtención de plantas libres de patógenos sistémicos, entre ellos los virus. Los meristemas son utilizados debido a que tiene poco o ningún virus por la elevada actividad metabólica (mitosis), presencia de sistema vascular poco diferenciado y altas concentraciones de auxinas endógenas (Conci, 2010).

La micropropagación es una técnica sofisticada para la rápida multiplicación de las plantas. Tiene un gran potencial comercial debido a la velocidad de propagación, la alta calidad de la planta y la capacidad de producir plantas libres de enfermedades. Este proceso permite reproducir *in vitro* cientos de clones de una misma especie e incluye varios pasos como cuidado de la planta, sección del explante y esterilización, formulación del medio para obtener proliferación, enraizamiento, aclimatación y crecimiento de las plántulas (Amhed *et al.*, 2001) (Figura 5).

## **2.9. Medio de Cultivo *in vitro* de *Rubus idaeus* L.**

Para estimular el crecimiento de las células se requieren diferentes nutrientes inorgánicos y orgánicos. Entre los inorgánicos se pueden

mencionar los macronutrientes (carbono, potasio, nitrógeno, fósforo, hidrógeno, oxígeno, magnesio, azufre y calcio) y micronutrientes (hierro, zinc, cloro, cobre, molibdeno, boro y manganeso). Generalmente las células en crecimiento pueden fabricar sus componentes orgánicos a partir de fuentes adecuadas de nitrógeno y carbohidratos suministrados por el medio de cultivo, sin embargo, existen además una cantidad de sustancias orgánicas adicionales que se requieren en cantidades mínimas y que son muy activas en el crecimiento (Roca *et al.*, 1991; Robles, 2009).

Muchas especies requieren para un desarrollo óptimo, la adición de reguladores de crecimiento, estos son compuestos orgánicos que se emplean en pequeñas cantidades que estimulan una respuesta fisiológica. Entre estos se encuentran las auxinas, citoquininas giberelinas, ácido abscísico y etileno (Jones, 2006).

Las auxinas son un grupo de compuestos reguladores del desarrollo de las plantas y se encuentran en mayores cantidades en las partes donde existe división celular, relacionado a las funciones fisiológicas tales como: elongación de tallos y coleótilos, formación de raíces adventicias, inducción de floración, diferenciación vascular, algunos tropismos y promoción de la dominancia apical. El ácido indol-3-acético (AIA) es la principal auxina endógena en la mayoría de plantas (Melgarejo, 2010). El transporte de auxinas es polar, en tallos siempre se presenta en sentido basipétalo (hacia la base) y en las raíces también es polar pero en sentido acropétalo (hacia los ápices). Las auxinas provocan un ablandamiento o aflojamiento de la pared, provocando que las células sean extensibles o plásticas (Gómez, 2010)

Las citoquininas son un grupo de reguladores del crecimiento que influyen en la división celular, que se derivan de adenina o aminopurina. Entre ellas se encuentra el BAP o benzil-aminopurina. Entre sus efectos fisiológicos destacan: la promoción de la división celular, la formación y crecimiento de brotes laterales, la maduración de los cloroplastos, la movilización de nutrientes hacia las hojas, retraso de la senescencia

(Jones *et al.*, 2006) y en compañía de auxina permite ejercer un marcado efecto en el incremento de la velocidad en la división celular y una participación en la síntesis de proteínas (Cárdenas, 2006). El transporte en la planta es por vía acropétala, desde el ápice de la raíz hasta los tallos, moviéndose a través de la savia en los vasos correspondientes al xilema (Harzie, 1998). Cabe mencionar, que un balance adecuado de auxinas y citoquininas *in vitro* induce la formación de yemas y/o raíces, dependiendo de la concentración de ambas y de la especie, lo que implica que las hojas jóvenes son capaces de producir las auxinas necesarias para el desarrollo adicional de la raíz y que cuando maduran sintetizan citoquininas que promueven la formación de brotes, ya sean primordios y hojas o yemas laterales (la principal fuente de citoquininas son las raíces) (Proaño, 2011).

Las giberelinas son sustancias promotoras del crecimiento, provocan la elongación de los tallos debido al alargamiento de las células, ya que aumentan la extensibilidad de la pared celular (Jones, 2006). La primera giberelina purificada y estructuralmente identificada fue el ácido giberélico ( $GA_3$ ); posteriormente se han aislado todas las demás (más de 40). Las giberelinas se encuentran presentes en muchas partes de las plantas, principalmente en las áreas de crecimiento activo, como en embriones o tejidos meristemáticos (Hernández, 2009).

En los estudios realizados por Donnelly, 1980 se determinó medios de cultivo para inducir el desarrollo del meristemo, la proliferación de brotes y el enraizamiento de dos variedades de frambuesa roja (Meeker y Willamette). Los explantes fueron esterilizados en solución al 10% de detergente (ingredientes activos 5.25 - 6% de hipoclorito de sodio) y sometidos a 3 enjuagues en intervalos de 15 minutos con agua destilada, luego aislaron meristemas (domo meristemático con 2 hojas primordiales  $\leq 0.25$  mm) y sembraron en medio de cultivo con sales de Murashigue and Skoog (1962). Como resultado, los meristemas cultivados en medio MS sin inositol ni hormonas y subcultivados en MS suplementado con

6BAP 1 mg/L e IBA 0.1 mg/L presentaron alta tasa de supervivencia. Asimismo, determinó que inositol en concentración de 150 mg/L estimula la proliferación de yemas axilares e inhibe el enraizamiento. Como medio de multiplicación, obtuvo que los explantes en medio con glucosa, IBA 0.1 mg/L y BAP a 1 mg/L durante 4 meses y transferidos a medio con BAP a 3 mg/L durante 3 meses, dan entre 9 a 35 esquejes, dependiendo de la selección. Por otro lado, en la etapa de enraizamiento observó que el ácido naftalenacético (NAA) causa proliferación de callo e induce la formación de raíces adventicias de los peciolos de hojas, láminas foliares y bases de brotes callosos, caso contrario, al ácido indolbutírico (IBA), donde el enraizamiento fue normal, asimismo, la tasa de enraizamiento en brotes obtenidos en medio de crecimiento fue mayor en medio sin inositol. Finalmente, determinó que el pH más adecuado fue 5.7 cuando el medio tiene sacarosa como fuente de carbohidratos.

Según los estudios realizados por Welander, 1987 en el desarrollo de un método de establecimiento de meristemos y de rápida propagación de *Rubus idaeus* variedad Vetén, observó que el crecimiento de meristemos mejora si la concentración de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y de  $\text{KNO}_3$  en el medio de Murashige and Skoog (MS) es reducido a la mitad de concentración y suplementado con 0.2 mg/L de BAP y 0.01 mg/L de IBA. Asimismo, obtuvo brotes axilares, usando medio MS modificado suplementado con 1 mg/L de BAP, siendo mejor a partir de segmentos nodales, mientras que a partir de brotes apicales no fue posible incrementar la tasa de proliferación. Asimismo, no se logró elongar los brotes al adicionar diferentes concentraciones de  $\text{GA}_3$  (1, 3 y 5 mg/L), fitohormona que inhibe el enraizamiento. Al utilizar la concentración de macronutrientes MS reducido a una quinta parte suplementado con IBA al 0.01 mg/L y tratamiento de oscuridad de 5 días, se logró 100% de plántulas enraizadas, las cuales sobreviven después de ser transferidas a suelo en  $\geq 95\%$ .

Hughes *et al.*, 2004 mencionan que para lograr el enraizamiento *in vitro* de plantas de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) variedad "Autumn Britten", "Boyne", "Comet", "Nova" y "Qualicum" se sembraron plántulas en medio de cultivo para enraizamiento con y sin carbón activado suplementado con 0.1; 0.5; 1.0; 2.0 y 3.0 mg/L de IBA durante 4 semanas. Como resultado obtuvieron que la adición de carbón activado incremento significativamente el porcentaje de plantas que produjeron raíces *in vitro* en los cultivares más difíciles de enraizar, asimismo, se logró mayor porcentaje de enraizamiento en los 3 niveles bajos de IBA (0.1; 0.5; 1.0 mg/L), y el número de raíces fue influenciado por el cultivar, mientras que el diámetro y longitud fue afectado por todos los factores investigados.

En los estudios realizados por Angelova *et al.*, 2006 sobre las condiciones óptimas para la multiplicación y enraizamiento de frambuesa variedad Willamette, se utilizaron como explantes yemas apicales de 2 cm de longitud, las cuales fueron extraídas y lavadas dos veces con agua de grifo durante una hora, luego fueron esterilizados por 10 minutos en 5% de hipoclorito de calcio en condiciones asépticas (bajo cabina de flujo laminar), y enjuagados en agua destilada estéril. Como resultado obtuvieron altos niveles de proliferación y multiplicación después de 90 días de cultivo utilizando medio MS con 100 mg/L de mio-inositol, 2 mg/L de tiamina-HCl, 1 mg/L de piridoxina-HCl, 1 mg/L de ácido nicotínico, 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar y BA (0.2 o 2 mg/L). Asimismo, obtuvieron 92% de enraizamiento y las plantas fueron transferidas a sustrato estéril en condiciones de alta humedad.

En la investigación establecimiento *in vitro* y pruebas preliminares de micropropagación en medio semisólido y líquido de frambuesa realizado en Costa Rica por Jones, 2006, se seleccionaron miniestacas de 3 a 4 cm de longitud y se desinfectaron superficialmente con 6g/L-1 Agri-mycin® y Bisolex® y 5g/L-1 Ferbam® por 60 min, seguida de una exposición a 3.5% de CaClO<sub>2</sub> por 15 min en bomba al vacío, logrando obtener 45% de supervivencia. Se seleccionaron 30 vitroplantas de 1 a 2 cm de longitud

con dos hojas desarrolladas y de buena apariencia, y se inocularon en medio de cultivo M&S suplementado con 2 mg/L de BAP, 1 mg/L de ácido giberelico (GA<sub>3</sub>), 100 mg/L de ácido ascórbico, 30 g/L de sacarosa y 3.5 g/L de phytigel (solo para medio semisólido), a pH de 5.5, luego se colocaron en el cuarto de crecimiento a temperatura de 22 ± 2 °C, con luminosidad de 2000 lux y fotoperíodo de 16 horas luz durante 3 semanas. Los resultados obtenidos en ambos sistemas fueron estadísticamente similares en relación a la brotación y crecimiento; sin embargo las vitroplantas en inmersión temporal presentaron mayor vigor y longitud.

Minas *et al.*, 2007 desarrollaron un método de micropropagación rápido *in vitro* de *Rubus idaeus* L. frambuesa roja de cultivares Autumn Bliss y Polana de primer año en fructificación. Para el trabajo utilizaron brotes apicales en crecimiento de diez centímetros de longitud, los cuales fueron esterilizados con 15 % de detergente comercial (0.78 % de hipoclorito de sodio) durante 20 minutos y 0.1 % v/v Tween 20 y sometidos a 3 enjuagues de 20 minutos en agua destilada estéril. Para el establecimiento de explantes, proliferación y crecimiento de brotes usaron medio MS modificado que contenía 5 g/L de carbón activado y doble concentración de lo normal de Fe- EDTA, sin reguladores de crecimiento a pH 5.8. Para la proliferación de brotes axilares usaron medio M&S suplementado con 0.1 – 4 mg/L de BAP (de acuerdo al cultivar), frecuentemente en combinación con 0.1 mg/L de IBA y los cultivos fueron incubados a condiciones de oscuridad a 22 ± 2 °C en el cuarto de crecimiento. El enraizamiento se obtuvo espontáneamente en cultivos o con medio MS a mitad de concentración de macronutrientes adicionando 0.1 a 1.6 mg/L de IBA, teniendo en cuenta que la temprana adición de 0.1 mM floriglucinol o 5 g/L de carbón activado mejora la formación de raíces en frambuesa roja.

En los estudios realizados por Chandra *et al.*, 2010 mencionan que la mortandad de plantas en la etapa de aclimatación es alta, debido a que

las plántulas *in vitro* no tienen funciones estomáticas, presentan sistema radical débil y desarrollo pobre de la cutícula, por lo cual necesitan ser gradualmente aclimatadas a condiciones de invernadero. Asimismo, Levitus *et al.* 2010 menciona que en esta etapa es necesario un control minucioso de los parámetros ambientales (humedad, temperatura y luz) de tal manera que permita disminuir la deshidratación y, al mismo tiempo, estimular la fotosíntesis para un rápido crecimiento de las plántulas. En la aclimatación de plántulas de frambuesa variedad Meeker y Willamette realizada por Donnelly, 1980 recomienda conservar alta humedad durante 10 a 14 días.

Para la elección del sustrato, Robles, 2009 sostiene que el sustrato con buenas características físicas es clave para el éxito de esta etapa, de preferencia se debe elegir un sustrato suelto, poroso, con mezcla de arena turba, cáscara de arroz, para permitir el desarrollo y crecimiento de raíces.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### **3.1. Obtención y manejo de plantas madre de frambuesa**

Las plantas madre de frambuesa *Rubus idaeus* variedad Heritage (80 plantas) en fase juvenil de primer año (primocane) de características fenotípicas de una planta sana y vigorosa con yemas apicales y axilares desarrolladas, y brotes en crecimiento, fueron adquiridas del vivero Los Inkas ubicado en el distrito de Surco, ciudad de Lima. Estas plantas fueron acondicionadas en el invernadero del Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma (Figura 6), con riego y fertilización adecuada, de acuerdo a los requerimientos de las plantas, y fueron tratadas con diclorvos & cipermetrina para evitar el ataque de áfidos, ácaros, entre otros.

#### **3.2. Determinación del tiempo de exposición de explantes en dos sustancias desinfectantes en la esterilización**

Se seleccionó 20 plantas madre sanas y de buena apariencia con tallos verdes y yemas axilares desarrolladas (Figura 7 A - B), con ayuda de una tijera se cortaron 80 segmentos de 2 – 3 cm de longitud (miniestacas) con una yema por explante (Figura 8 A - B), los cuales fueron lavados con detergente y agua potable. A continuación, con ayuda de un bisturí se retiró la epidermis de los explantes, y en cámara de flujo laminar fueron sumergidos en alcohol de 96° por 1 min y sometidos a 4 tratamientos de desinfección: tratamiento 1 (T1) y 2 (T2) se utilizó cloruro de mercurio

(HgCl<sub>2</sub>) al 0.1 % con tiempos de exposición de 10 y 5 minutos respectivamente, mientras que en los tratamientos 3 (T3) y 4 (T4) se utilizó hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.5 % con tiempos de exposición de 15 y 10 minutos respectivamente (Tabla 1). Terminado los tiempos de exposición (Figura 9), fueron enjuagados 5 veces con agua destilada estéril con intervalos de 5 minutos cada uno, luego se aislaron los ápices meristemáticos con dos primordios foliares con ayuda de un bisturí N°11 y de un estereoscopio binocular marca Leica EZ2 a 30x (Figura 10 A - D), y en el caso de las miniestacas, se cortó el tejido despigmentado o fenolizado del extremo de los explantes (Figura 11). Ambos fueron introducidos *in vitro* en tubos de ensayo con medio Murashige and Skoog, 1962 (MS) (Tabla 2) sembrando un (01) explante por tubo e incubados en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 22 – 25 °C ± 2 °C con fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (Figura 12).

La unidad experimental de esterilización consistió en un (01) explante por tubo, con diez repeticiones por tratamiento para cada tipo de explante (miniestaca y ápice meristemático). Las variables evaluadas visualmente fueron porcentaje de contaminación, fenolización y sobrevivencia a los 7, 14, 21 y 30 días de la introducción *in vitro*. El criterio de evaluación para porcentaje de contaminación fue considerar la presencia y ausencia de hongos (micelio) y bacterias (colonias) en el explante en cultivo y se calificó con 1 la presencia y con 0 la ausencia. En el caso de porcentaje de fenolización se registró la presencia y ausencia de tejidos necrosados y/o la formación de un halo color pardo o negro en la base del explante y se calificó igual que la variable anterior. Para determinar el porcentaje de sobrevivencia, se consideró como explantes vivos a aquellos que mantuvieron las características iniciales y se calificaron con 1, mientras que los muertos por fenolización o contaminación se calificaron con 0 (Tabla 3)

### **3.3. Determinación de la concentración de sales del medio de cultivo MS como medio de iniciación (MI) *in vitro***

Como medio de iniciación (MI), se utilizó medio MS en 4 tratamientos con diferentes concentraciones de sales: tratamiento 1 (T1), 2 (T2), 3 (T3) y 4 (T4) con concentración de sales: 100%, 75% (3/4), 50% (1/2) y 25% (1/4) respectivamente (Tabla 4). En todos los tratamientos, el medio de cultivo fue suplementado con 30 g/L de sacarosa, 3.4 g/L de phytigel y el pH fue ajustado a 5.7, luego fueron servidos 7 mL por tubo de 150 mm x 25 mm marca Pyrex y esterilizados en autoclave por 20 minutos a 121°C y a 15 libras de presión.

Los explantes fueron esterilizados bajo cámara de flujo laminar, luego se aislaron los ápices meristemáticos con dos primordios foliares y se acondicionó las miniestacas de acuerdo a la metodología del ítem 3.2. Ambos explantes fueron introducidos *in vitro* en tubos de ensayo con MI según tratamiento (un explante por tubo), e incubados en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 22 – 25 °C ± 2 °C con fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Se consideró como unidad experimental un (01) explante por cada tubo, con diez repeticiones por tratamiento para cada tipo de explante (miniestaca y ápice meristemático). Las variables evaluadas visualmente fueron formación de brotes, longitud de brotes, número de hojas y color de hojas a los 7, 14, 21 y 30 días de la introducción *in vitro*. Se determinó la formación de brotes, cuando el explante (ápices meristemáticos y miniestacas) presentó desarrollo de brotes, lo cual se calificó con 1, mientras que la ausencia de brote se calificó con 0 (Tabla 5). Asimismo, se midió la longitud del brote a los 30 días en centímetros (cm) desde el nudo de formación del brote hasta la yema apical terminal utilizando papel milimetrado. Para determinar el número de hojas, se cuantificó el número total de hojas desarrolladas por tratamiento, mientras que para la variable

color de hojas se consideró como categorías de color: amarillo (A), verde vitrificado (VV), verde claro (VC), verde (V), verde oscuro (VO), marrón (M) y explante negro (N), y se cuantificó el número de explantes que presentó cada categoría de color.

### **3.4. Determinación de la concentración de citoquinina (6-BAP) y giberelina (GA<sub>3</sub>) para multiplicación clonal *in vitro***

En la multiplicación, se utilizó medio de iniciación (MI) en 7 tratamientos suplementado con reguladores de crecimiento 6-bencilaminopurina (6-BAP) y ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) en diferentes concentraciones: tratamiento 1 (T1) MI sin reguladores de crecimiento, tratamiento 2 (T2), 3 (T3) y 4 (T4) MI suplementado con 1; 1,5 y 3 mg/L de 6-BAP respectivamente, tratamiento 5 (T5) con MI + 1 mg/L de 6-BAP + 0,5 mg/L de GA<sub>3</sub>; tratamiento 6 (T6) con MI + 1,5 mg/L de 6-BAP + 1 mg/L de GA<sub>3</sub>; y tratamiento 7 (T7) con MI + 2 mg/L de 6-BAP + 1 mg/L de GA<sub>3</sub> (Tabla 6). En todos los tratamientos, la concentración de sacarosa, phytigel y pH del medio de cultivo fue de acuerdo al ítem 3.3. Estos medios fueron servidos en magentas y en tubos de 150mm x 25 mm marca Pyrex, y esterilizados en autoclave.

Las plántulas o brotes provenientes de la etapa de iniciación (Figura 13) con un tamaño entre 0,5 a 1 cm con 3 - 4 hojas desarrolladas y miniestacas de 0.5 a 1 cm con 4 a 5 nudos por explante (Figura 14 y 15) fueron transferidas en el medio de cultivo de multiplicación (un explante por magenta y tubo), e incubadas en el cuarto de crecimiento manteniendo las mismas condiciones como en la etapa de iniciación durante 42 días.

Se tomó como unidad experimental un (01) segmento apical por cada magenta y una (01) miniestaca por tubo, con diez repeticiones por

tratamiento. Las variables evaluadas visualmente fueron número y altura de brotes, coeficiente de multiplicación (CM) y tasa de velocidad de multiplicación (TVM) a los 7, 14, 21, 30 y 42 días del cultivo *in vitro*. Para determinar el número de brotes, se cuantificó los brotes que se desarrollan en las yemas axilares por tratamiento, asimismo, se determinó la altura del brote en centímetros (cm) desde el nudo de formación del brote hasta la yema apical terminal utilizando papel milimetrado, teniendo en cuenta que los brotes < 0,1 cm se consideraron con valor 0.05 cm. El coeficiente de multiplicación (CM) (número de plántulas finales / número de explantes establecidos) se determinó utilizando la metodología de Sigarroa- Rieche *et al.*, 2012 en su trabajo con *Rubus glaucus* Benth y la tasa de velocidad de multiplicación (TVM) descrita en Schuter *et al.*, 2005 expresa la relación entre el número de explantes obtenidos al final del ciclo, menos el número de explantes introducidos al ciclo de la fase de multiplicación, sobre el tiempo (t) durante el ciclo.

$$TVM = \frac{\text{N}^\circ \text{ de explantes finales} - \text{N}^\circ \text{ de explantes introducidos}}{t}$$

### **3.5. Determinación de la concentración de auxina (AIA) para enraizamiento de plántulas *in vitro***

Como medio de cultivo de enraizamiento se utilizó medio MS con concentración de sales al 100 % y 50 % suplementado con ácido indoacético (AIA) en diferentes concentraciones: tratamiento 1 (T1), 2 (T2), 3 (T3) y 4 (T4) con MS (100%) suplementado con 0, 0.5, 1 y 2 mg/L de AIA respectivamente, tratamiento 5 (T5) con MS (100%) + 1 mg/L de AIA + 500 mg/L de carbón activado, mientras que el tratamiento 6 (T6), 7 (T7), 8 (T8) y 9 (T9) con MS (50%) suplementado con 0, 0.5, 1 y 2 mg/L de AIA respectivamente, y tratamiento 10 (T10) con MS (50%) + 1 mg/L de AIA + 500 mg/L de carbón activado (antioxidante) (Tabla 7). En todos

los tratamientos, la concentración de sacarosa, phytigel y pH del medio de cultivo fue de acuerdo al ítem 3.3. Estos medios fueron servidos en magenta de vidrio y esterilizados en autoclave.

Las plántulas *in vitro* mayores a 1 – 1.5 cm (Figura 16) fueron transferidas al medio de enraizamiento 1 plántula por magenta bajo cámara de flujo laminar y llevados al cuarto de crecimiento a temperatura de 22 – 25 °C ± 2 °C con fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

La unidad experimental consistió en un (01) explante por cada magenta, con diez repeticiones por tratamiento. Las variables evaluadas visualmente fueron porcentaje de enraizamiento, número de raíces y longitud de raíces a los 10, 20 y 30 días. Para determinar el porcentaje de enraizamiento se cuantificó el número de plántulas que desarrollan al menos una raíz con longitud mínima de 0.1 cm y para el número de raíces se consideró el total de raíces desarrolladas por tratamiento y su longitud se midió en centímetros (cm) desde la base de la raíz hasta el extremo final utilizando papel milimetrado.

### **3.6. Establecimiento del sistema de aclimatación de plántulas de *Rubus idaeus* L.**

En la aclimatación de plántulas se utilizó sustrato previamente esterilizado, en 3 tratamientos: tratamiento 1 (T1) y 2 (T2) con turba: arena en proporción 1:1 y 2:1 v/v respectivamente, y tratamiento 3 (T3) con turba: arena: humus en proporción 1:1:1 v/v (Tabla 8). Todos los sustratos fueron esterilizados en autoclave por 60 minutos a 121.1°C y a 15 libras de presión, luego fueron distribuidos en bandejas de PVC de 35 celdas de 5 x 5 x 11 cm de ancho x largo x altura, previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio a 100 ppm (Figura 17 A - B).

Las plántulas *in vitro* con 2 - 3 raíces verdaderas fueron extraídas cuidadosamente de la magenta de cultivo y sumergidas en agua destilada

para retirar los restos del agente gelificante (phytagel) de las raíces, luego fueron transferidas a las bandejas con sustrato humedecido con agua destilada una (01) plántula por celda y a continuación, regadas con agua destilada y medio líquido con sales de MS. Las bandejas de 35 celdas fueron colocadas en una cámara de aclimatación de plástico transparente bajo condiciones controladas a temperatura 22-25°C, fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (Figura 18 A - F). La cobertura de la cámara de aclimatación se abrió gradualmente durante 8 días con un intervalo de 15, 20, 30, 40, 60, 120, 180 y 240 minutos hasta la aclimatación a condiciones ambientales. Durante esta etapa, se aplicó riego interdiario con agua destilada, nutrición mineral con sales de MS. Transcurrido los 30 días, las plantas aclimatadas fueron transferidas en bolsas de polietileno de 7" x 7" con el mismo sustrato y se mantuvo en condiciones de invernadero (Figura 19 A - F).

La unidad experimental consistió en una (01) planta por cada celda, con 35 repeticiones por tratamiento. Las variables evaluadas visualmente fueron altura de la planta y porcentaje de plantas aclimatadas a los 7, 14, 21 y 30 días de la transferencia al sustrato. Para determinar el porcentaje de plantas aclimatadas, se registró el número de plantas que presentaron características fenotípicas de una planta sana y vigorosa, y se midió la altura de plántulas aclimatadas en centímetros (cm) desde el sustrato hasta la yema apical terminal utilizando papel milimetrado (Figura 19 C - D).

Posteriormente, las plántulas aclimatadas en bolsas, fueron trasladadas al invernadero del CITEvid en Guadalupe – Ica para su aclimatación a condiciones ambientales de la zona y luego fueron transferidas a campo definitivo en la hacienda Bodega Sotelo en San Juan Bautista – Ica, donde las plantas se adaptaron y fructificaron con el fin de elaborar vino de frambuesa.

### **3.7. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos en cada una de las etapas del trabajo de investigación se analizaron utilizando el paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 21 y Microsoft Excel 2010. Los análisis estadísticos a un nivel de significancia de 0,05 fueron: Test de probabilidad exacta de Fisher, Prueba de Kruskal Wallis, Prueba de ANOVA por una vía y Prueba de Tukey.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Determinación del tiempo de exposición de explantes en dos sustancias desinfectantes en la esterilización

#### 4.1.1. Porcentaje de contaminación, fenolización y sobrevivencia de ápices meristemáticos

Los resultados obtenidos en la evaluación del tiempo exposición de explantes a hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) al 2.5 % y cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) al 0.1% en la esterilización para el cultivo de ápices meristemáticos, mostraron que los 4 tratamientos presentaron 0 % contaminación hasta los 30 días (Tabla 9), lo que demuestra que la introducción *in vitro* de ápices meristemáticos disminuye la probabilidad de contaminación, y que estos están libres de bacterias y virus. Por otro lado, se observó que la desinfección con  $\text{NaClO}$  al 2.5 % por 10 (tratamiento 4) y 15 minutos (tratamiento 3), presentaron menor porcentaje de fenolización de ápices meristemáticos con 20 y 10 % (Tabla 10, Figura 20), esta diferencia probablemente se debe a la manipulación del explante, sin embargo estadísticamente no presentó diferencia significativa (test de probabilidad exacta de Fisher muestra,  $p=1$ ) (Tabla 11). La desinfección con  $\text{HgCl}_2$  al 0.1% con tiempo de exposición de 10 (tratamiento 1) y 5 minutos (tratamiento 2), presentaron mayor porcentaje de fenolización de ápices meristemáticos con 40 % y 30 % respectivamente (Tabla 10 y Figura 21 A), lo cual indica que  $\text{HgCl}_2$  presenta un mayor efecto abrasivo en el explante, ocasionando la presencia de compuestos fenólicos difíciles de remover en el enjuague con agua destilada.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos (Figura 23 y Tabla 12), se observó que la desinfección de explantes con NaOCl al 2.5 % por 15 minutos (tratamiento 3) presentó mayor porcentaje de sobrevivencia de ápices meristemáticos con 100 % a los 7 días y 90 % a los 14, 21 y 30 días, mientras que con tiempo de exposición de 10 minutos (tratamiento 4) presentó 80 % de sobrevivencia (7 - 30 días). La desinfección de explantes con HgCl<sub>2</sub> al 0.1 % presentó menor porcentaje de sobrevivencia con 60 % y 70 % para el tratamiento 1 y 2 respectivamente (Figura 22 B). Por consiguiente, se optó utilizar hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.5 % por 15 minutos en la desinfección de explantes para el cultivo de ápices meristemáticos.

#### **4.1.2. Porcentaje de contaminación, fenolización y sobrevivencia de miniestacas**

Los resultados obtenidos en la evaluación del tiempo de exposición de explantes en las sustancias desinfectantes en la esterilización para el cultivo de miniestacas (Figura 23 y Tabla 13), mostraron que HgCl<sub>2</sub> al 0.1 % por 10 minutos (tratamiento 1) presentó 0 % de contaminación, mientras que NaClO al 2.5 % por 15 minutos (tratamiento 3), presentó 20 % de miniestacas contaminadas por hongos y bacterias a los 30 días de cultivo, sin embargo, estadísticamente no presentó diferencia significativa (test de probabilidad exacta de Fisher,  $p=0.474$ ) (Tabla 14). Los tratamientos con menor tiempo de exposición, HgCl<sub>2</sub> al 0.1 % por 5 minutos (tratamiento 2) e NaClO al 2.5 % por 10 minutos (tratamiento 4), presentaron mayor porcentaje de contaminación 30 y 50 % respectivamente (Figura 24). Por otro lado, se observó que el tratamiento 3 y 4 presentaron menor porcentaje de fenolización 10 % y 0 % respectivamente (Figura 26 B), mientras que el tratamiento 1 y 2 presentaron 30 % y 20 % respectivamente a los 30 días (Figura 26 A, Figura 25 y Tabla 15). Es importante tener en cuenta la naturaleza del desinfectante HgCl<sub>2</sub> y la dificultad para remover los compuestos fenólicos

del explante, por lo cual es necesario aplicar mayor número de enjuagues después de la desinfección.

Los resultados del porcentaje de sobrevivencia (Figura 27 y Tabla 16) muestran que el tratamiento 1 y 3 presentaron 70 % de sobrevivencia, mientras que el tratamiento 2 y 4 presentaron 50% de sobrevivencia. De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó utilizar cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) al 0.1% por 10 minutos (tratamiento 1) en la desinfección de miniestacas, debido a su efecto positivo en la ausencia de contaminación de explantes y mayor porcentaje de sobrevivencia.

## **4.2. Determinación de la concentración de sales del medio de cultivo MS como medio de iniciación (MI) *in vitro* de ápices meristemáticos**

### **4.2.1. Formación de brotes, número de hojas y porcentaje de color de hojas de ápices meristemáticos**

Como resultado de la evaluación de la concentración de sales del medio MS en el cultivo de ápices meristemáticos, se observó la ausencia de formación de tallo o brotes en todos los tratamientos a los 30 días de evaluación (Figura 28 A - D), razón por la que los explantes cultivados en medio con sales completas (tratamiento 1) y 3/4 (tratamiento 2) fueron subcultivados en medios frescos, observándose el inicio de formación de tallo en los explantes del tratamiento 1 a los 50 días, mientras que en tratamiento 2 no se observó (Figura 29 A - B).

Los resultados obtenidos en Figura 30, 31, 32, 33, 34 y 35 en relación a la formación de hojas, número y color de hojas, muestran que en el

tratamiento 1 se observó el desarrollo de hojas en un 70% de ápices meristemáticos a los 14 días, incrementándose a 90% a los 30 días, con un total de 19 hojas verdes. En los tratamientos 2, 3 y 4, se observó 40, 30 y 10 % de explantes que desarrollaron hojas respectivamente presentando color verde, verde claro, amarillo y marrón a los 14 días, incrementándose a 70, 50 y 40% a los 30 días, con un total de 15, 8 y 6 hojas respectivamente presentando color verde (10-30%), verde claro (30-50%), verde oscuro (10%), amarillo (30%), marrón (10-20%) y negro (10-30%). La presencia de diferentes categorías de color de hojas (verde claro, verde oscuro, amarillo y marrón), se atribuye a la deficiencia de nutrientes en los medios de cultivo de menor concentración de sales, en comparación con el tratamiento 1.

### **4.3. Determinación de la concentración de sales del medio de cultivo MS como medio de iniciación (MI) *in vitro* de miniestacas**

#### **4.3.1. Formación y altura de brotes, número de hojas y porcentaje de color de hojas de miniestacas**

Los resultados obtenidos en Figura 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 y Tabla 17, 19 en el cultivo de miniestacas, muestran que en el tratamiento 1 se observó el desarrollo de brotes con hojas verdes en un 50% a los 7 días (Figura 43), incrementándose a un 80% a los 14 días, de los cuales 10% presentaron hojas verde claro, 10% vitrificadas y 50% verde (Figura 44 A y 45 A), alcanzando a los 30 días de evaluación, brotes de 1.088 cm de altura promedio con un total de 53 hojas desarrolladas, en su mayoría color verde claro (Figura 47 A - B). En los tratamientos 2, 3 y 4 se observó 40, 40 y 20% respectivamente de miniestacas con brotes de color verde, verde oscuro y marrón a los 7 días de evaluación. A los 14 días, en el tratamiento 2 se observó 50% de brotes de color verde (50%), verde

oscuro (10%) y vitrificadas (30%) (Figura 44 B y 45 B), mientras que en los tratamientos 3 y 4 se observó 50 y 40% de brotes, incrementándose a 60 y 50 % respectivamente a los 21 días (Figura 46 A - B), y a los 30 días de evaluación se observó 60, 60 y 50% de brotes con 0.800; 0.550 y 0.280 cm de altura promedio, con un total de 39, 28 y 16 hojas respectivamente, en su mayoría color verde claro (Figura 48 A – B, 49 A – B y 50 A - B). En este ensayo, los resultados estadísticos muestran que no existe diferencia significativa entre los tratamientos 1 y 2 en la formación de brotes (test de probabilidad exacta de Fisher,  $p=0.628$ ), ni en la media de la altura de brotes de todos los tratamientos (prueba de ANOVA,  $p=0.178$ ) (Tabla 18 y 20).

#### **4.4. Determinación de la concentración de citoquinina (6-BAP) y giberelina ( $GA_3$ ) para multiplicación clonal *in vitro* de segmentos apicales**

##### **4.4.1. Número y altura de brotes**

Los resultados obtenidos en la multiplicación a partir de segmentos apicales *in vitro* Figura 51, 52, 53, Tabla 21, 22 y 23, muestran a los 42 días que en el medio suplementado con 1.5 mg/L de 6BAP (tratamiento 3) se obtuvieron  $1.8 \pm 0.42$  brotes de  $0.281 \pm 0.058$  cm de altura promedio, en comparación con el tratamiento 1 (control), que evidencia estadísticamente diferencia significativa en el número de brotes (Prueba de Kruskal Wallis comparaciones por pareja,  $p=0.008$ ) (Tabla 22). Sin embargo, el incremento de 6-BAP a 3 mg/L (tratamiento 4) muestra disminución del desarrollo y longitud de brotes con  $1.3 \pm 0.60$  brotes de  $0.162 \pm 0.032$  cm de longitud promedio, efecto similar se observó al suplementar el medio de cultivo con 1 mg/L de 6-BAP más 0.5 mg/L de  $GA_3$  (tratamiento 5) con  $1.5 \pm 0.31$  brotes de  $0.237 \pm 0.056$  cm de longitud

promedio, al igual que al incrementar la concentración de 6-BAP a 1.5 mg/L y a 2 mg/L más 1 mg/L de GA<sub>3</sub> (tratamiento 6 y 7), lo cual indica que el uso de GA<sub>3</sub> en sinergia con 6-BAP no favorece la proliferación y crecimiento de brotes.

#### **4.4.2. Coeficiente de multiplicación (CM) y Tasa de velocidad de multiplicación (TVM)**

Los resultados obtenidos en Figura 54 y 55, muestran a los 42 días que el medio suplementado con 1.5 mg/L de 6-BAP (tratamiento 3) tuvo influencia positiva en cuanto al coeficiente de multiplicación (CM) con 1.8 brotes y en la tasa de velocidad de multiplicación (TVM) con 0.19 explantes/día, en comparación con el tratamiento 1 (control). Los otros tratamientos evaluados presentaron  $CM \leq 1.5$  brotes y  $TVM \leq 0.1$  explantes/día.

### **4.5. Determinación de la concentración de citoquinina (6-BAP) y giberelina (GA<sub>3</sub>) para multiplicación clonal *in vitro* de miniestacas**

#### **4.5.1. Número y altura de brotes**

Los resultados obtenidos en la multiplicación de miniestacas Figura 56, 57, 58, Tabla 24, 25 y 26, muestran a los 42 días que en el medio suplementado con 1 mg/L de 6-BAP y 0.5 mg/L de GA<sub>3</sub> (tratamiento 5) se obtuvieron 54 brotes con un promedio de  $5.4 \pm 0.98$  brotes/explante de  $0.201 \pm 0.032$  cm de altura promedio, en comparación con el tratamiento 1 (control), que evidencia estadísticamente diferencia significativa en el número de brotes (Prueba de Kruskal Wallis comparación por parejas,  $p=0.021$ ) (Tabla 25), lo cual indica el efecto positivo del 6-BAP en presencia de GA<sub>3</sub> en la formación de brotes. Sin embargo, los medios de cultivo

suplementados con 1 mg/L; 1.5 mg/L o 3mg/L de 6-BAP inhiben el desarrollo y crecimiento de brotes, en comparación con los medios de cultivo suplementados con 1.5 mg/L de 6-BAP más 1 mg/L de GA<sub>3</sub> (tratamiento 6) y 2 mg/L de 6-BAP más 1 mg/L de GA<sub>3</sub> (tratamiento 7), que muestran la influencia positiva de GA<sub>3</sub> en cuanto a altura de brotes, sin embargo, estadísticamente no existe diferencia significativa en el desarrollo de brotes (altura de brotes) en los 7 tratamientos evaluados (Prueba de Kruskal Wallis,  $p= 0.385$ ) (Tabla 26).

#### **4.5.2. Coeficiente de multiplicación y Tasa de velocidad de multiplicación (TVM)**

Los resultados obtenidos en Figura 59 y 60, muestran que a los 42 días que el medio suplementado con 1 mg/L de 6BAP + 0.5 mg/L de GA<sub>3</sub> (tratamiento 5) tuvo influencia positiva en cuanto al coeficiente de multiplicación (CM) con 5.4 brotes y en la tasa de velocidad de multiplicación (TVM) con 1.05 explantes/día, en comparación con el tratamiento 1 (control). Los otros medios de multiplicación alcanzaron  $CM \leq 4.6$  brotes y  $TVM \leq 0.81$  explantes/día.

#### **4.6. Determinación de la concentración de auxina (AIA) para enraizamiento de plántulas *in vitro***

##### **4.6.1. Porcentaje de enraizamiento**

Los resultados obtenidos en Figura 61, muestran que los medios de cultivo a 1/2 concentración suplementados con 1 y 2 mg/L de AIA (tratamiento 8 y 9) se obtuvo 70% de plántulas enraizadas, en comparación con el medio MS al 100% suplementado con 2 mg/L de AIA

(tratamiento 4), demostrando la influencia de AIA en el enraizamiento de las plántulas micropropagadas a los 30 días.

#### **4.6.2. Número y longitud de raíces**

Los resultados obtenidos en Figuras 62, 63, Tabla 27 y 28 muestran que el medio de cultivo a 1/2 concentración suplementado con 1 mg/L de AIA (tratamiento 8) presentó 35 raíces ( $3.5 \pm 1.014$  raíces promedio) y suplementado con 2 mg/L de AIA (tratamiento 9) presentó 28 raíces ( $2.8 \pm 0.975$  raíces promedio) a los 30 días de evaluación. Estos resultados sometidos a evaluación estadística muestran que no existe diferencia estadísticamente significativa (Prueba de Kruskal Wallis,  $p=1.00$ ), pero los tratamientos 4 y 8 presentaron diferencias significativa (Prueba de Kruskal Wallis,  $p=0.028$ ) (Tabla 28).

En relación a la longitud de raíces, Figura 64 y Tabla 29, muestran que los medio de cultivo de 100% MS y 1/2 concentración (tratamiento 1 y 6) permitieron el desarrollo de raíces (longitud) en un promedio de  $2.347 \pm 0.476$  cm y  $3.217 \text{ cm} \pm 0.513$  respectivamente a los 30 días, entre los cuales no existe diferencias significativa (Prueba de Kruskal Wallis comparaciones por parejas,  $p=1.00$ ), en comparación a los medios suplementados con 1 mg/L y 2 mg/L AIA, no obstante la adición de 500 mg/L de carbón activado al medio suplementado con 1mg/L influyó positivamente en el desarrollo de la longitud de raíces en  $2.073 \pm 0.367$  y  $1.800 \pm 0.309$  cm respectivamente.

## **4.7. Establecimiento del sistema de aclimatación de plántulas de *Rubus idaeus* L.**

### **4.7.1. Porcentaje de plántulas aclimatadas**

Los resultados obtenidos en la Figura 65, muestran que el sustrato turba: arena en proporción 1:1 (tratamiento 1) y 2:1 v/v (tratamiento 2) permitieron aclimatar 100 % de plántulas entre 7 a 30 días, mientras que el sustrato turba:arena:humus en proporción 1:1:1 v/v (tratamiento 3) solo permitió aclimatar 60% a los 21 días y 42,9% a los 30 días (Figura 67, 68, 69 y 70), lo cual indica que la composición de sustrato con turba y arena permite el desarrollo de las plantas y la absorción de nutrientes, y que la adición de humus no favorece debido a la mortandad de plántulas.

### **4.7.2. Altura de plántulas aclimatadas**

Los resultados obtenidos en la Figura 66 y Tabla 30, muestran que el sustrato turba: arena en proporción 1:1 v/v (tratamiento 1) presentó plántulas aclimatadas de  $1.574 \pm 0.031$  cm de altura promedio a los 7 días, mientras que sustrato turba: arena en proporción 2:1 v/v (tratamiento 2) presentó mayor crecimiento de plántulas aclimatadas con 1.723 cm. Al finalizar la evaluación (30 días), se observó que el tratamiento 1 alcanzó mayor crecimiento de plántulas aclimatadas con  $2.889 \pm 0.081$  cm de altura promedio, mientras que el tratamiento 2 y 3 lograron  $2.709 \pm 0.119$  cm y  $2.67 \pm 0.083$  cm respectivamente. Estadísticamente, no existe diferencia significativa según tratamiento 1 y 2 (Prueba de Kruskal Wallis comparaciones por parejas,  $p=0.278$ ), no obstante según tratamiento 1 y 3 difieren significativamente (Prueba de Kruskal Wallis comparaciones por parejas,  $p=0.000$ ), así como tratamiento 2 y 3 (Prueba de Kruskal Wallis comparaciones por parejas,  $p=0.002$ ).

El sistema de aclimatación permitió obtener 500 plantas aclimatadas en condiciones de invernadero con altura de 10 cm. Las plantas se adaptaron en sustrato turba: arena (1:1 v/v) a las condiciones de Ica en el

invernadero del CITEvid presentando altura entre 120 cm a 220 cm, floración y primera fructificación a los 6 meses (Figura 71 A - B). Posteriormente, se logró la adaptación de las plantas de frambuesa en parcela demostrativa en la hacienda de Bodega Sotelo en Ica, donde se obtuvo frutos con 11.5 °Brix, de 3.5 a 4.2 cm de longitud, de 2.3 a 2.5 g y rendimiento de 465 g/ planta (Figura 71 C - E), con los cuales se logró elaborar y obtener vino de frambuesa (Figura 71 F).

## V. DISCUSIÓN

### 5.1. Determinación del tiempo de exposición de explantes en dos sustancias desinfectantes en la esterilización

El ambiente generado por explante – medio de cultivo – condiciones físicas de incubación en el establecimiento de cultivo *in vitro* permite la proliferación de bacterias, hongos y levaduras, sistémicos o superficiales del explante. Estos microorganismos contaminan y afectan los cultivos *in vitro*, por tanto es necesario realizar la desinfección superficial de los explantes utilizando soluciones desinfectantes, los cuales inhiben las reacciones enzimáticas y desnaturalizan las proteínas de los microorganismos. El desinfectante más usado es hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$  – agente oxidante) de 1 – 3 % debido a su fácil enjuague. Con menor frecuencia se utiliza hipoclorito de calcio ( $\text{CaClO}_2$ ) de 6 – 12% y cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) de 0.01 – 1.5 % durante 3 a 10 minutos, siendo este último compuesto altamente tóxico y difícil de remover del explante durante el enjuague (Mroginski *et al.* 2010; Roca *et al.*, 1991; Sánchez 2005). Asimismo, los autores recomiendan realizar enjuagues con agua destilada estéril con un volumen por lo menos 10 a 20 veces mayor, con un mínimo de tres enjuagues sucesivos. En la presente investigación se utilizó hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) al 2.5% por 15 minutos en el cultivo de ápices meristemáticos y cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) al 0.1% por 10 minutos en el cultivo de miniestacas *in vitro* de *Rubus idaeus* variedad Heritage, logrando inhibir al 100% el crecimiento de bacterias y hongos, lo cual corrobora lo mencionado en la literatura.

En los ensayos de desinfección de explantes para el cultivo de ápices meristemáticos se logró 90% de sobrevivencia utilizando  $\text{NaClO}$  al 2.5% por 15 minutos sin afectar los tejidos del explante. Este resultado difiere

con lo reportado por Stoevska *et al.* 1995, quienes lograron 85 – 90 % de sobrevivencia en la desinfección de explantes en el cultivo de meristemos de frambuesa variedades Shopska Alena y Samodiva usando como solución desinfectante  $\text{HgCl}_2$  al 0.1% por 3 minutos, mientras que al utilizar  $\text{NaClO}$  al 15% observaron alto nivel de desinfección sin desarrollo del explante.

En la desinfección de miniestacas se logró obtener 0% de contaminación con  $\text{HgCl}_2$  al 0.1% por 10 min en la desinfección de miniestacas, sin utilizar una metodología compleja como la propuesta por Jones, 2006 quien utilizó fungicidas, bactericidas e hipoclorito de calcio ( $\text{CaClO}_2$ ) al 3.5% por 15 min con bomba al vacío en la desinfección de miniestacas de frambuesa, sin embargo obtuvieron 51.67 % - 65 % de contaminación, sin lograr reducir la carga microbiana.

La fenolización es la presencia de compuestos fenólicos oxidados catalizados por la enzima polifenoloxidasas (PPO) para producir quinonas, las cuales al reaccionar generan daño e incluso la muerte celular. Estos compuestos fenólicos se encuentran en los tejidos vegetales sometidos a situaciones de estrés tales como: el efecto abrasivo del agente desinfectante, corte del explante y composición del medio de cultivo, evidenciado por el cambio de color del tejido rojo carmelita en el medio de cultivo (Olmos *et al.* 2004, Azofeifa 2009, Concepción *et al.* 2005, Olivera 2010). En el presente trabajo, se evidenció 10 % de fenolización en la desinfección de explantes en el cultivo de ápices meristemáticos con  $\text{NaClO}$  al 2.5 % por 15 minutos y 30 % de fenolización en la desinfección de miniestacas con  $\text{HgCl}_2$  al 0.1 % por 10 minutos siendo este último el que causó mayor estrés en los explantes debido a la naturaleza del desinfectante, lo que indica disminuir el tiempo de exposición o realizar más enjuagues con agua destilada para remover los fenoles oxidados del explante, tal como recomienda George 1996, quien sostiene que al reducir el tiempo del proceso de esterilización con el agente desinfectante y al aplicar enjuagues al explante con agua destilada estéril se elimina

efectivamente el agente desinfectante, así como remueve los fenoles oxidados y otros productos presentes en el tejido.

## **5.2. Determinación de la concentración de sales del medio de cultivo MS como medio de iniciación (MI) *in vitro***

La nutrición mineral es uno de los principales componentes en el medio de cultivo *in vitro*, debido a que son constituyentes de las moléculas esenciales en las células vegetales y cumplen una función en la estructura celular, promoviendo el desarrollo de la plántula. El medio más usado en la micropropagación de frambuesa es Murashigue and Skoog (MS), el cual es rico en nutrientes minerales (macroelementos, microelementos) en comparación con otros medios de cultivo, lo cual permite el óptimo crecimiento como también hiperhidratación, callogénesis, clorosis, hojas necrosadas y moteadas en muchos cultivares (Poothong 2014). La deficiencia de nutrientes ocurre cuando un nutriente esencial no está disponible en la cantidad suficiente para cumplir los requerimientos de una planta en crecimiento, y la toxicidad ocurre cuando el elemento esencial está en exceso a las necesidades y disminuye el crecimiento y calidad de la planta (McCauley *et al.*, 2009). En la presente investigación, se logró la introducción de ápices meristemáticos y miniestacas *in vitro* de *Rubus idaeus* variedad Heritage en el medio de Murashigue and Skoog con sales completas, mientras que los explantes introducidos en 3/4, 1/2 y 1/4 presentaron hojas con síntomas de deficiencia nutricional, lo que corrobora lo mencionado en la literatura.

En el establecimiento del medio de iniciación de ápices meristemáticos de *Rubus idaeus* variedad Heritage, se logró 100% de explantes sin cambio de color y 90% de explantes con desarrollo de hojas en medio MS con sales completas, sin embargo se observó la formación del tallo después

de 50 días del subcultivo en medio fresco. Este resultado es corroborado con lo reportado por Minas *et al.* 2007, quienes recomiendan el medio de cultivo MS como el mejor para la mayoría de variedades de frambuesa. Asimismo en el trabajo de Angelova *et al.* 2006 con frambuesa variedad Vilamet, obtuvieron alto nivel de regeneración en medio MS, ya que los meristemas fueron subcultivados en medio fresco cada dos semanas y a las 8 semanas de cultivo se observó la formación de hojas e inicio de la multiplicación. Esto nos indica la necesidad de realizar subcultivos sucesivos de los ápices meristemáticos en medio MS o suplementado con fitohormonas para obtener brotes, tal como describe Donnelly 1980, quien realizó la introducción de ápices meristemáticos de frambuesa variedad Meeker y Willamette *in vitro* de 0.35 mm de longitud en medio sin fitohormonas durante 4 semanas y de 3 a 4 transferencias sucesivas en medio suplementado con 1 mg/L BAP y 0.1 mg/L IBA obteniendo la proliferación de yemas axilares.

En el establecimiento del medio de iniciación de miniestacas se observó 80% de explantes con desarrollo de brotes de 1.088 cm de altura promedio en medio MS con sales completas sin fitohormonas, tal como indica Jones, 2006, quien realizó el cultivo de miniestacas de frambuesa en medio de cultivo MS suplementado con 1.5 mg/L de 6-BAP, 30g/L de sacarosa, 3.5 g/L de phytigel con pH 5, y llegó a la conclusión que este medio permite un buen desarrollo de las yemas.

### **5.3. Determinación de la concentración de citoquinina (6-BAP) y giberelina (AG<sub>3</sub>) para multiplicación clonal *in vitro***

Los resultados de la investigación muestran que utilizando la concentración completa de MS enriquecido con 1 mg/L de 6-BAP y 0.5 mg/L de GA<sub>3</sub>, permite obtener 54 brotes en 42 días a partir de segmentos

nodales (miniestacas), mientras que al cultivar segmentos apicales en medio con 1.5 mg/L de 6BAP se obtuvieron 18 brotes. Este resultado es corroborado por Welander 1985, quien reporta que en la etapa de multiplicación *in vitro* de frambuesa variedad Autumn Bliss y Polana se obtiene brotes axilares usando medio MS a media concentración suplementado con 1 mg/L BAP a partir de brotes apicales y segmentos nodales, sin embargo no se evidencio el incremento del número de yemas axilares formados a partir de los brotes, en comparación con los segmentos nodales, donde se lograron mejores resultados.

Por otra parte, en el trabajo de Sobczykiewicz 1987 con otras variedades de frambuesa, se logró evidenciar que la proliferación de las plántulas *in vitro* está relacionada con las transferencias sucesivas, logrando en promedio de 6 a 18 brotes en la 4ta transferencia. En el presente trabajo, se logró obtener la cantidad de 5.4 brotes/ explante en el primer subcultivo en medio MS suplementado con 1 mg/L de 6-BAP y 0.5 mg/L de GA<sub>3</sub>, lo que hace suponer que conforme se subcultive, incrementaría el número de brotes. Por su parte, Berástegui *et al.* 2003, logró multiplicar frambuesa variedad Autum Bliss a partir de microtallos en medio suplementado con 4.5µM de 6-BAP obteniendo tasa de multiplicación de 5.62±1.96 brotes. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente trabajo con la variedad Heritage.

#### **5.4. Determinación de la concentración de auxina (AIA) para enraizamiento de plántulas *in vitro***

En la presente investigación se logró el enraizamiento de plántulas *in vitro* de frambuesa variedad Heritage en un 70% con 3.5 raíces promedio utilizando medio MS a mitad de concentración suplementado con 1 mg/L de ácido indolacético (AIA). Este resultado es similar a lo reportado por

Hernández *et al.*, 1999, quienes lograron brotes enraizados de *Rubus glaucus* Bent (Mora de Castilla) utilizando medio MS a mitad de concentración con 2 mg/L de AIA con 9 raíces promedio. Sin embargo, las investigaciones realizadas por Sobczykiewicz 1987, menciona que la formación de raíces en brotes de frambuesa variedad Canby, Norna, Rubin y Veten se logró en el medio con ácido indol butírico (IBA) y el porcentaje de plantas enraizadas fue de 73 a 85%, además lograron mejor resultado adicionando floroglucinol con 98 a 100% de brotes enraizados. Por su parte, Donnelly 1980, reporta 100% de enraizamiento de brotes en medio enriquecido con 0.5 mg/L de IBA, mientras que en medio enriquecido con NAA, observó la formación de callo y enraizamiento anormal. Este resultado es corroborado por la investigación de Oliva 2006, quien menciona que algunos autores prefieren usar auxinas sintéticas como IBA para el enraizamiento de plantas, debido a que el AIA puede ser inactivado por enzimas oxidasas presentes en la planta y en especial, la ácido indol acético oxidasa, la cual disminuye el efecto sobre el enraizamiento.

Por otro lado, Poncetta *et al.* 2012 y Stoevska *et al.* 1995, mencionan que el medio MS en concentraciones de 1/4 y 1/2 suplementado con 0.2 – 0.5 mg/L de IBA permite el enraizamiento de brotes apicales de otras variedades de frambuesa en un 87% y promueve el incremento del número de raíces por brote, mientras que dosis de 2 mg/L de IBA causa formación de callo y raíces cortas. En el presente trabajo, se corrobora el uso de medio MS a 1/2 de concentración en el enraizamiento de plántulas *in vitro* de frambuesa variedad Heritage,

## **5.5. Establecimiento del sistema de aclimatación de plantas de *Rubus idaeus* L.**

La aclimatación de plántulas a condiciones ambientales, es una etapa importante dentro de la técnica de propagación *in vitro*, debido a que en

esta etapa ocurre gran mortandad, por tanto, se recomienda aclimatar en condiciones de alta humedad relativa y baja intensidad lumínica cercano a las condiciones *in vitro*, las cuales se reducen durante la etapa de aclimatación hasta alcanzar las condiciones de campo (Rugama *et al.*, 1998). Asimismo, Mroginski *et al.* 2010, menciona que en la aclimatación es importante controlar los parámetros ambientales, de tal manera que permita disminuir la deshidratación y al mismo tiempo estimular la fotosíntesis. En el presente trabajo se logró adaptar una cámara de aclimatación que permitió aclimatar las plántulas *in vitro* a condiciones ambientales al 100% a los 8 días en sustrato turba:arena en proporción 1:1 y 2:1, el cual tiene una estructura adecuada para la absorción de nutrientes y el intercambio gaseoso. Este resultado se corroborará con los trabajos desarrollados por Sobczykiewicz, 1987, quien utilizó como sustrato arena: turba en proporción 2:1 v/v para la aclimatación de plántulas de frambuesa variedad Canby, Norna, Rubin y Vetten en 3 a 4 semanas.

Algunos autores como Mroginski *et al.* 2010, recomiendan el uso de túneles de polietileno o cámaras climatizadas equipadas con sensores que permitan un descenso paulatino de la humedad relativa, mientras que Minas *et al.*, 2007, utilizó macetas con turba estéril cubiertas con vasos de plástico, lo cual permitió obtener plántulas aclimatadas en un 95 %. En la presente investigación, se utilizó cámaras de aclimatación de plástico transparente con capacidad para una (01) bandeja con 35 celdas, y con cobertura móvil, para abrir gradualmente durante 8 días para evitar la deshidratación y mortandad de plántulas.

## VI. CONCLUSIONES

1. Se logró la desinfección del 100% de explantes de *Rubus idaeus* variedad Heritage utilizando hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2.5 % a un tiempo de exposición de 15 minutos y cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) al 0.1 % a un tiempo de exposición 10 minutos para el cultivo de ápices meristemáticos y miniestacas respectivamente.
2. Se estableció que la concentración completa de sales MS permite obtener 90% de ápices meristemáticos desarrollados sin cambio de color en 50 días y 80% de brotes desarrollados a partir de yemas de miniestacas en 30 días.
3. Se logró establecer el medio de multiplicación MS suplementado con 1.5 mg/L de 6-BAP para segmentos apicales que permite obtener  $1.8 \pm 0.42$  brotes/explante en promedio y medio MS suplementado con 1 mg/L de 6-BAP y 0.5 mg/L de GA<sub>3</sub> para miniestacas que permite obtener  $5.4 \pm 0.98$  brotes/explante en promedio.
4. Se estableció el medio de enraizamiento MS a mitad de concentración suplementado con 1 mg/L de AIA que permite lograr 70% de plántulas enraizadas con  $3.5 \pm 1.014$  raíces/ explante.
5. Se logró adaptar una cámara de aclimatación que permite obtener 100% de plántulas aclimatadas a condiciones ambientales en sustrato turba: arena en proporción 1:1 y 1:2 V/V con  $2.889 \pm 0.081$ cm y  $2.709 \pm 0.119$  cm de altura promedio respectivamente.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar ensayos utilizando fitohormonas en el cultivo inicial de los explantes para mejorar el tiempo de crecimiento.
2. Realizar experimentos en la multiplicación clonal evaluando otras concentraciones y combinaciones de fitohormonas para incrementar la tasa de velocidad de multiplicación.
3. Desarrollar más ensayos con auxinas en el enraizamiento de plántulas para incrementar el porcentaje de plántulas enraizadas.
4. Se recomienda realizar ensayos con otras variedades de frambuesa que se adapten a las condiciones de la Costa.
5. Se recomienda realizar la certificación de las plántulas *in vitro* que permita brindar garantía a los productores.

## VIII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

Abdelnour- Esquivel A, Vincent J. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Cartago, Costa Rica: Editorial Turrialba, CATIE/CEE/CIRAD; 1994.

Ahmed Z, Akhter F, Shamsul M, Banu H, Motiur M, Faruquzzaman A. Novel micropropagation system. J. of Biological Sciences, 2001; 1(11):1106-1111. Disponible en: <http://198.170.104.138/jbs/2001/1106-1111.pdf>

Angelova E, Arsov T. Investigation of different media content on meristem organization of raspberry (*Rubus idaeus*) in conditions *in vitro*. Pomologia Croatica.2006;12(4):271-274

Araya M. Estudio preliminar de la composición química y el valor nutricional de frutos regionales de interés económico y socio cultural de Magallanes. [Trabajo de titulación para optar el título de ingeniero en química y medio ambiente]. Facultad de Ingeniería. Universidad de Magallanes. Punta Arenas, Chile. 2010.

Azofeifa A. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agronomía Mesoamericana 2009; 20(1):153-175.

Berástegui A., Perales S., Perez L., Walicki V., Peneff R. Una estrategia de producción regional: micropropagación clonal de *Rubus idaeus* cvs. Autumn Bliss y Tulameen. Bol. Soc. Argent. Bot. 2003;38:171-172.

Biolib [sitio web]. Germany: Der virtuellen biologischen Bibliothek von Kurt Stueber; 2007 [acceso 08 de abril del 2016]. Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz (1885) – *Rubus idaeus*. [aproximadamente 2 pantallas]. Disponible en [http://biolib.mpipz.mpg.de/thome/band3/tafel\\_081\\_small.jpg](http://biolib.mpipz.mpg.de/thome/band3/tafel_081_small.jpg).

Cancino-Escalante G, Barbosa D, Carvajal C. Diversidad genética de especies silvestres y cultivadas de *Rubus* L. de los municipios de Pamplona y Chitagá, región Nororiental de Colombia. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, 2012; 10(1):80-89.

Cárdenas R. Evaluación del efecto de la aplicación de citoquininas en yemas no apicales para inducir brotación en tallos de rosa con ciclo de crecimiento largo. [trabajo de grado para optar el título de ingeniero de producción agroindustrial]. Facultad de Ingeniería. Universidad de la Sabana. Chia. 2006.

Carrera, M. El frambueso. Hojas divulgadoras, 1974;(1):1-24

Chandra S, Bandopadhyay R, Kumar V, Chandra R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. Biotechnol Lett. 2010. 32:1190-1205.

Concepción O., Nápoles L., Pérez A., Peralta N., Hernández M., Trujillo R. Efecto de tres antioxidantes en el cultivo in vitro de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.). Relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. Cultivos tropicales 2005; 26(1): 33-39.

Conci V. Capítulo 9 Utilización de cultivos de tejidos para la obtención y conservación de plantas libres de virus. En: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski, editores. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Buenos Aires, Argentina: Editorial; 2010.

D'Arcy C, Eastburn D, Schumann G. Illustrated Glossary of Plant Pathology [Sitio web]. APS – The American Phytopathological Society, 2001. [Fecha de acceso: 10 de abril del 2016]. Disponible en: <http://www.apsnet.org/edcenter/illglossary/Pages/I-M.aspx#meristem>

Donnelly D. *In vitro* culture of four *Rubus* species [Thesis for the degree of Master of Science]. Canada: The University of British Columbia; 1980.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT (Database). Producción de frambuesa de los 5 principales productores Promedio 2013-2014 (Latest update: 07 Mar 2014) Accessed (08 abril 2016). <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>

George E. Plant propagation by tissue culture, part 2. In practice. 2ed. Exegetics Limited. England; 1996.

Gómez S. Evaluación de la propagación *in vitro* en cinco clones promisorios de cacao (*Theobroma cacao* L.). [Tesis para optar el título profesional de ingeniero agrónomo]. Facultad de Agronomía. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala, 2010.

Graham J., Woodhead M. Raspberries and blackberries: The genomics of *Rubus*. En: Folta K, Gardiner S (ed.). Genetics of Rosaceae, plant genetics and genomics. New York, USA. 2009:507-524.

Harzie N., GuUloteau A., Huyghe C. *In vitro* shoot formation of *Lupinus albus* from cotyledonary node. In: 3rd European conference on grain legumes. Opportunites for high quality, healthy and added-value crops to meet European demands. Valladolid, Spain; 1998.

Hernández C., Lopera M., Mora B., Cárdenas J. Desarrollo de un protocolo para la propagación masiva de la Mora de Castilla (*Rubus glaucus* Bent) mediante la utilización del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Actual Biol, 1999;21(70): 3-12.

Hernández P. Universidad Nacional Abierta y a Distancia - Cultivo de tejidos [Sitio web]. Bogotá- Colombia, Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD; 2009. [Fecha de acceso: 10 de abril del 2016]. Lección 3.2.1 Cultivo de meristemas [Aproximadamente 2 pantallas]. Disponible en:  
[atateca.unad.edu.co/contenidos/203024/2013/203024/leccin\\_321\\_cultivo\\_de\\_meristemas.html](http://atateca.unad.edu.co/contenidos/203024/2013/203024/leccin_321_cultivo_de_meristemas.html)

Hughes B, Cook W, Keith C. Rooting medium composition and *in vitro* rooting and greenhouse survival of five raspberry cultivars. HortScience. 2004;39:788

Hummer K. *Rubus* diversity. HORTSCIENCE, 1996; 31(2):182-183.

International Raspberry Organization (IRO). IRO Members Information [Sitio en internet]. Acceso el 13 de octubre del 2014. Disponible en: <http://www.internationalraspberry.net/iro-member>.

Jones F. Establecimiento *in vitro* y micropropagación de Frambuesa (*Rubus idaeus* L.) utilizando medio semisólido y medio líquido en Rita ® [Informe de trabajo final para optar el título de bachiller en ingeniería en biotecnología]. Cartago: Instituto Tecnológico de Costa Rica; 2006.

Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L. Editores. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Segunda Edición. Buenos Aires, Argentina: Ediciones INTA; 2010.

Liu M, Qi X, Weber C, Yong C, Brown J, Hai R. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. J. Agric. Food Chem., 2002; 50: 2926-2930.

Liu Y, Liu M, Li B, Jin-Lu Z, Chun-Peng Z, Luo-Qiang L, et al. Fresh raspberry phytochemical extract inhibits hepatic lesion in a Wistar rat model. Nutrition & Metabolism, 2010; 7:84.

Manzano M. Proyecto de factibilidad para la creación de una empresa productora y comercializadora de frambuesas para su exportación a los Estados Unidos de América, ubicada en Puenbo, provincia de Pichincha. [Tesis para optar el título de ingeniero comercial]. Universidad Politécnica Salesiana. Quito. 2013.

McCauley A., Jones C., Jacobsen J. Plant nutrient functions and deficiency and toxicity symptoms, Montana State University Extension, Bozeman, MT. 2009; 9:1-16.

Melgarejo L. Editor. Experimentos en Fisiología Vegetal. Primera edición. Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia; 2010.

Minas G, Neocleous D. A protocol for rapid clonal micropropagation *in vitro* of primocane – fruiting red raspberry cultivars. Miscellaneous Reports. 2007; 95:1-7

Mora M. Biodiversidad y algunos aspectos de distribución biogeográfico de *Rubus* sp. en el estado Tachira. [Tesis para optar el grado de ingeniero agrónomo]. San Cristóbal, Venezuela: Universidad Nacional experimental del Táchira; 2011.

Morales C. Editor. Cultivo de berries: Consideraciones generales. Boletín INIA N° 187. Villa Alegre: Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA; 2009.

Morimoto C, Satoh Y, Hara M, Inoue S, Tsujita T, Okuda H. Anti-obese action of raspberry ketone. Life Sciences, 2005; 77:194-204.

Mroginski L, Sansberro P, Flaschland. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski, editores. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Buenos Aires, Argentina: Editorial; 2010.

Murashigue T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 1962;15:473-497.

Oliva H. El enraizamiento de esquejes en los frutales tropicales. *Revista CitriFrut*, 2006;23(2):63-64.

Olivera P, Tamariz C, Gutierrez- Correa M. Desinfección e influencia del bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalénacético (ANA) en la multiplicación *in vitro* de *Perezia coerulescens* Wedd, planta medicinal altoandina. *Rev. Aporte Santiaguino*, 2010;3(1):117-124.

Olmos S., Luciani G., Galdeano E. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. En: Viviana Echenique, Clara Rubinstein y Luis Mroginski. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Buenos Aires: Ediciones INTA; 2004. 161-172.

Parodi, G. Consultor. Estudio de pre-factibilidad para el desarrollo del cultivo de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) en condiciones andinas. [Sitio en internet]. Publicado en el 2013. Acceso el 13 de octubre del 2014. Disponible en: <http://hortintl.cals.ncsu.edu/es/articles/estudio-de-pre-factibilidad-para-el-desarrollo-del-cultivo-de-frambuesa-rubus-idaeus-l-en-c>

Pérez-Molphe B, Ramírez-Malagón R, Nuñez-Palenius H y Ochoa-Alejo N. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México; 1999.

Poothong S. Improving *In Vitro* Mineral Nutrition for Diverse Red Raspberry and *Rubus* Germplasm [Tesis doctoral]. Oregon State University.2014.

Proaño A. Regeneración y conservación mediante la técnica de crecimiento mínimo de *Lupinus mutabilis* (chocho andino) in vitro. [Informe de proyecto para optar el título de ingeniero agropecuario]. Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias Sangolquí. Sandolquí, Ecuador. 2011.

Ramírez R. La frambuesa peruana: una oportunidad prometedora. Agro Enfoque PE, 2007; 22(157):42-48.

Regiones con negocios y potencial de frambuesa [mapa político]. Perú. Sierra Exportadora, Perú Berries - Localización de los proyectos; 2016. Disponible en: <http://www.sierraexportadora.gob.pe/programas/berries/localizacion.php>

Robles, E. Efecto de la brasinolide sobre la formación y elongación de brotes adventicios de frambuesa (*Rubus idaeus*) *in vitro* [tesis de grado]. Facultad de Agrobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan, Michoacán, México. 2009.

Roca, W., Mroginski, L.A. 1991. Cultivos de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Palmira, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)

Rugama C, Hernández R. Micropropagación de dos clones de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) ISA 96-110 E ISA 96-111 [Trabajo de Tesis para optar por el grado de Ingeniero agrónomo]. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional Agraria CENIDA .Managua, Nicaragua. 1998.

San Martín, J. Situación varietal de la frambuesa. En: Undurraga P, Vargas S, editores. Manual de Frambuesa. Boletín INIA N° 264. Chillán, Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA; 2013. p.11-14.

Sánchez L, Sáenz E. Antisépticos y desinfectantes. Dermatología Peruana, 2005; 15(2):82-103.

Schuter I., Baquero S., Gaona D., Vega E., Rodríguez J., Ramírez C., et al. Propagación *in vitro* de material seleccionado de *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. (Ocobo) y *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken (Nogal Cafetero). Rev. Colombiana de Biotecnología; 2005. 7(1):39-50.

Seeram N, Adams L, Zhang Y, Lee R, Sand D, Scheuller H, Heber D. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006; 54:9329-9339

Sierra exportadora. Perfil comercial de Frambuesa [Sitio en internet]. Acceso el 13 de octubre del 2014. Disponible en:

<http://www.sierraexportadora.gob.pe/perfil-comercial-de-la-frambuesa-deshidratada/>

Sigarroa-Rieche A, García-Delgado C. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth.) variedad sin espinas, mediante ápices meristemáticos. Acta agronómica, 2012; 60(4):347-354.

Sistema de Información de Biodiversidad. Taxonomía para *Rubus*. [En línea]. Dirección URL: <http://www.sib.gov.ar/taxonomia/genero/rubus>. Consultada: 19 de agosto del 2014.

Sobczykiewicz D. Mass production of raspberry plants by meristem culture. Acta horticulturae, 1987; 212:607-609.

Stoevska T., Trifonova A., Karadocheva D. Micropropagation of Raspberries (*Rubus idaeus*). Biotechnology y Biotechnological Equipment; 1995.9(2):27-30.

USDA NRCS. The PLANTS database, version 4.0. Consultado el 19 de agosto del 2014 en <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=RUID>. National Plant Data Team, Greensboro, NC 27401-4901 USA.

Weber C, Liu M, Qi X, Hai R. Antioxidant capacity and anticancer properties of red raspberry. New York Fruit Quarterly, 2001; 9(3):13-15.

Welander M. *In vitro* culture of raspberry (*Rubus idaeus*) for mass propagation and virus elimination. Symposium on In Vitro Problems Related to Mass Propagation of Horticultural Plants. 1987;212:610

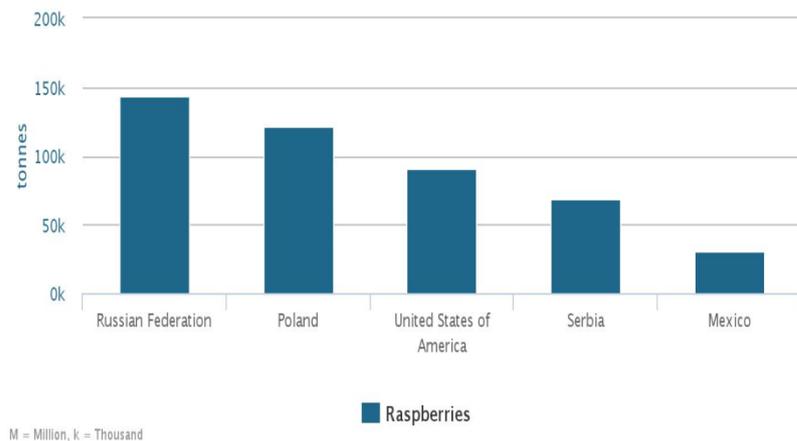
## IX. ANEXOS

### 9.1. Figuras



**Figura 1. Planta de frambuesa *Rubus idaeus* L.**

Fuente: Prof. Dr. Otto Wilhelm Thomé Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz 1885, Gera, Germany en Biolib, 2007.



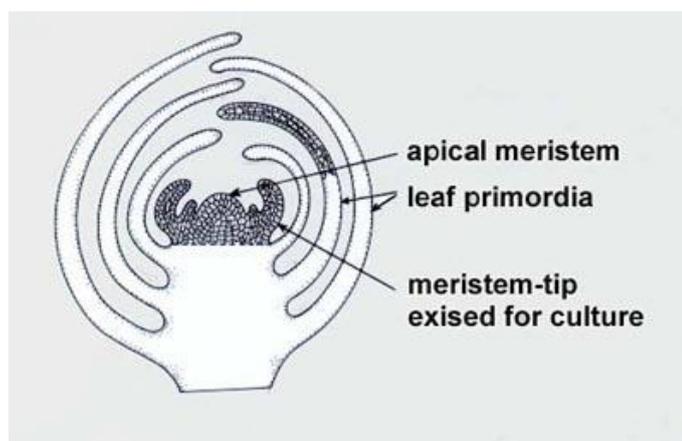
**Figura 2. Producción de frambuesa de los 5 principales productores a nivel mundial entre 2013 al 2014.**

Fuente: FAOSTAT, 2016



**Figura 3. Mapa de regiones del Perú con cultivos de frambuesa.**

Fuente: Sierra Exportadora, 2016



**Figura 4. Esquema ilustrativo del meristemo apical y primordios foliares.**

Fuente: D'Arcy *et al.*, 2001.

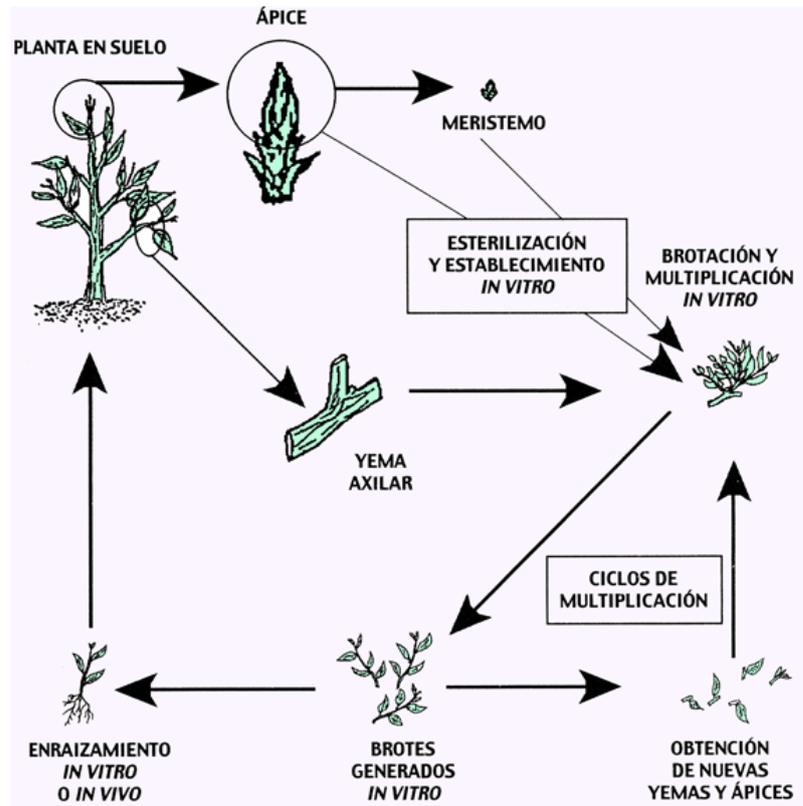


Figura 5. Sistema de propagación por cultivo de meristemos o yemas.

Fuente: Hernández, 2009



Figura 6. Plantas madre de frambuesa *Rubus idaeus* variedad Heritage en invernadero de la universidad Ricardo Palma

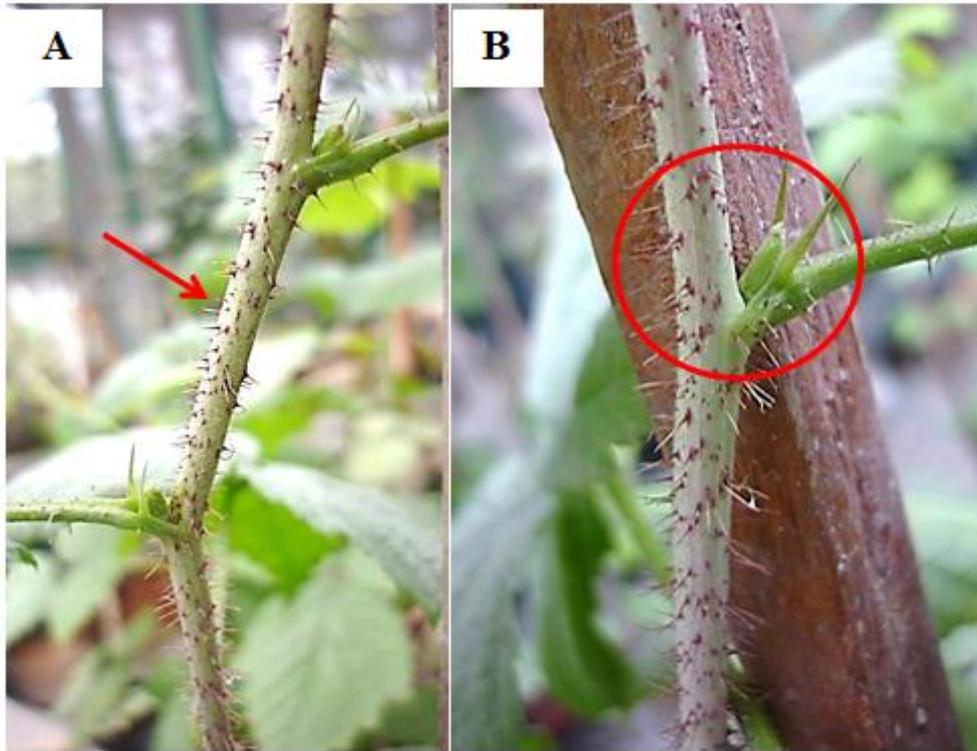


Figura 7. A. Yemas en etapa primocane. B. Vista de yema axilar

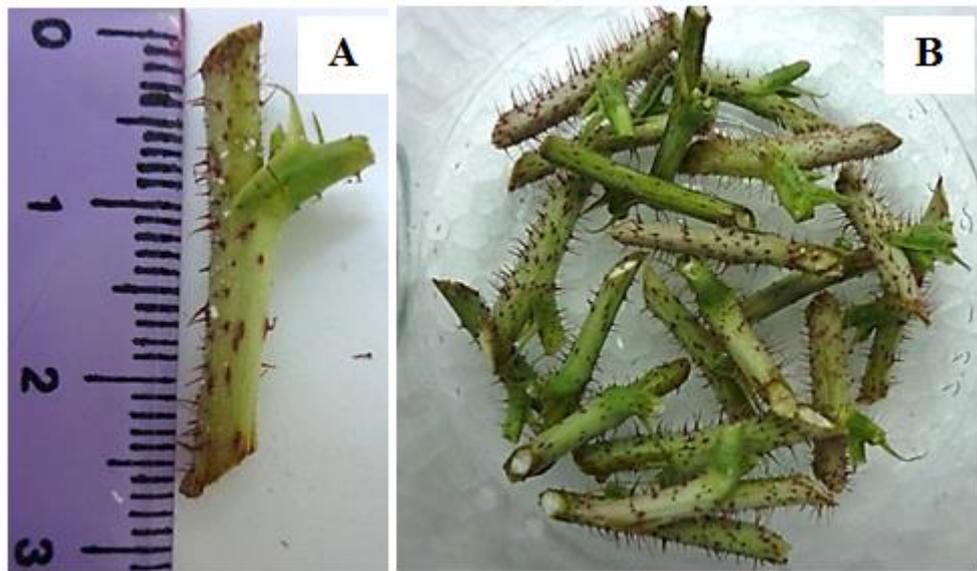


Figura 8. A y B. Miniestacas de 2 -3 cm de longitud con yema



Figura 9. Miniestacas desinfectadas.

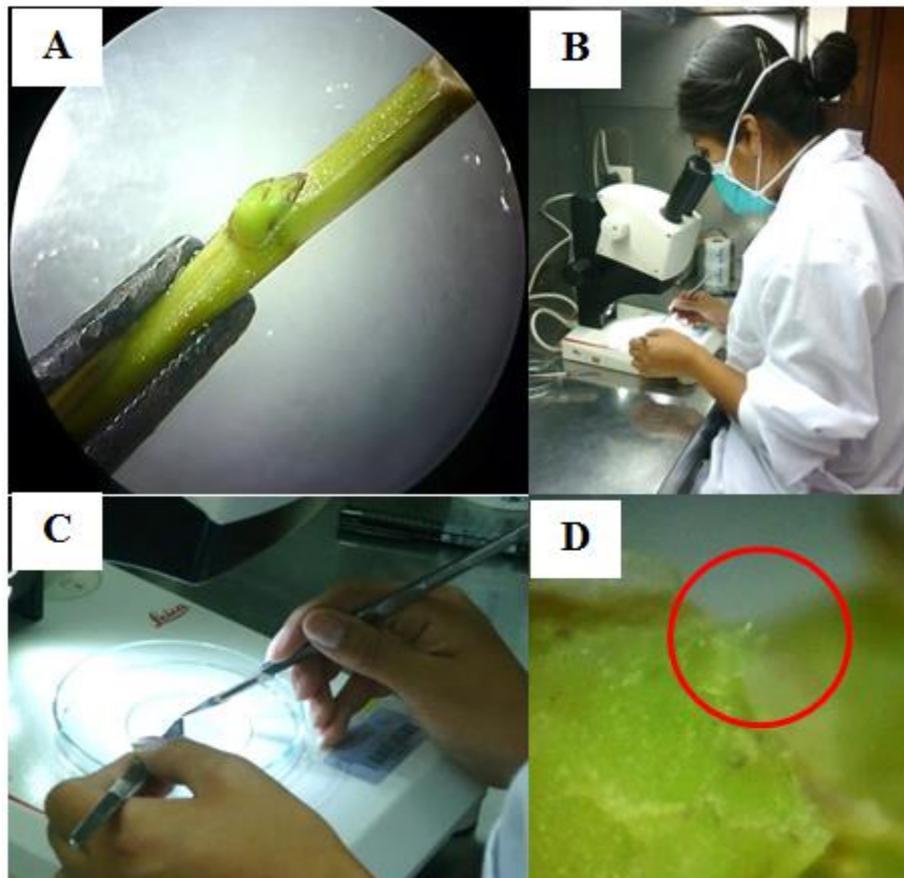


Figura 10. A Vista de miniestaca. B y C. Aislamiento de ápices meristemáticos. D. Ápice meristemático con dos primordios foliares a 30x



Figura 11. Corte de tejido fenolizado en miniestaca (líneas rojas).



Figura 12. Explantes (ápices meristemático y miniestaca) *in vitro*



Figura 13. Plántulas in vitro de *Rubus idaeus* var. Heritage

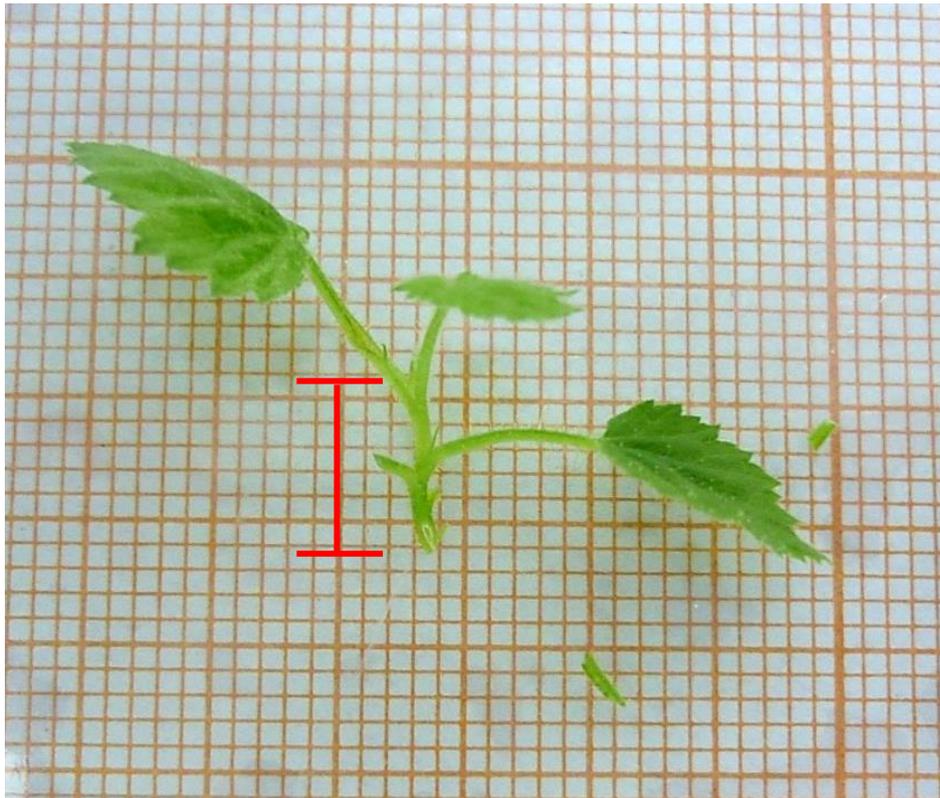


Figura 14. Segmento apical para la multiplicación clonal

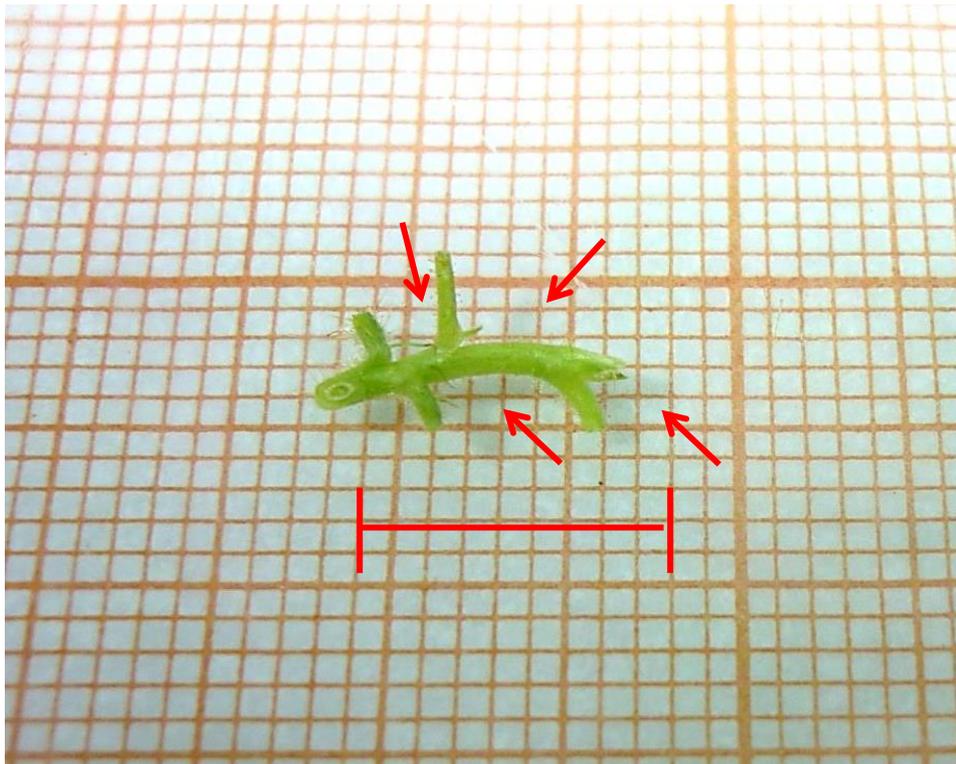


Figura 15. Miniestaca con yemas para la multiplicación clonal

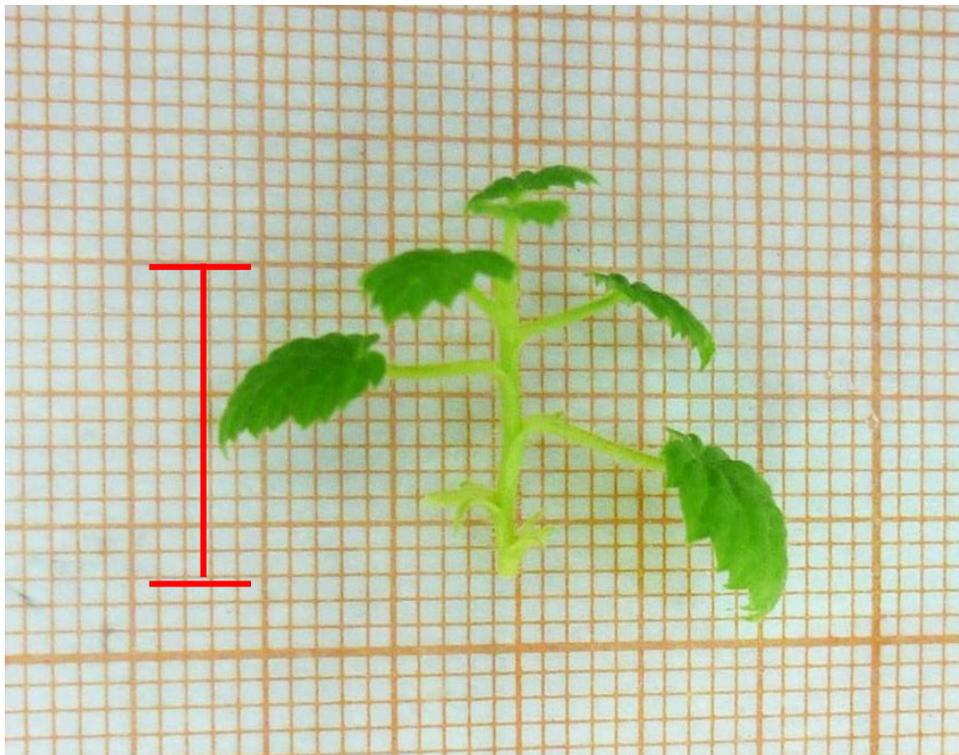


Figura 16. Plántula *in vitro* entre 1 – 1.5 cm para el enraizamiento

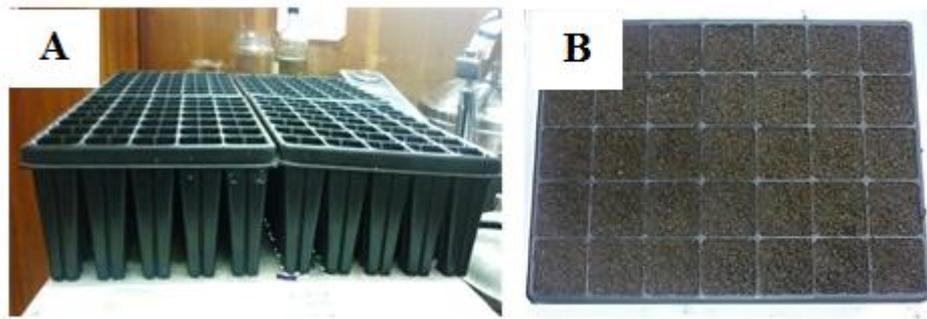


Figura 17. A y B. Bandejas de PVC de 35 celdas con sustrato estéril



Figura 18. A y B. Plántulas enraizadas. C y D. Transferencia de plántulas en sustrato. E y F. Bandejas con plántulas establecidas en cámaras de aclimatación.

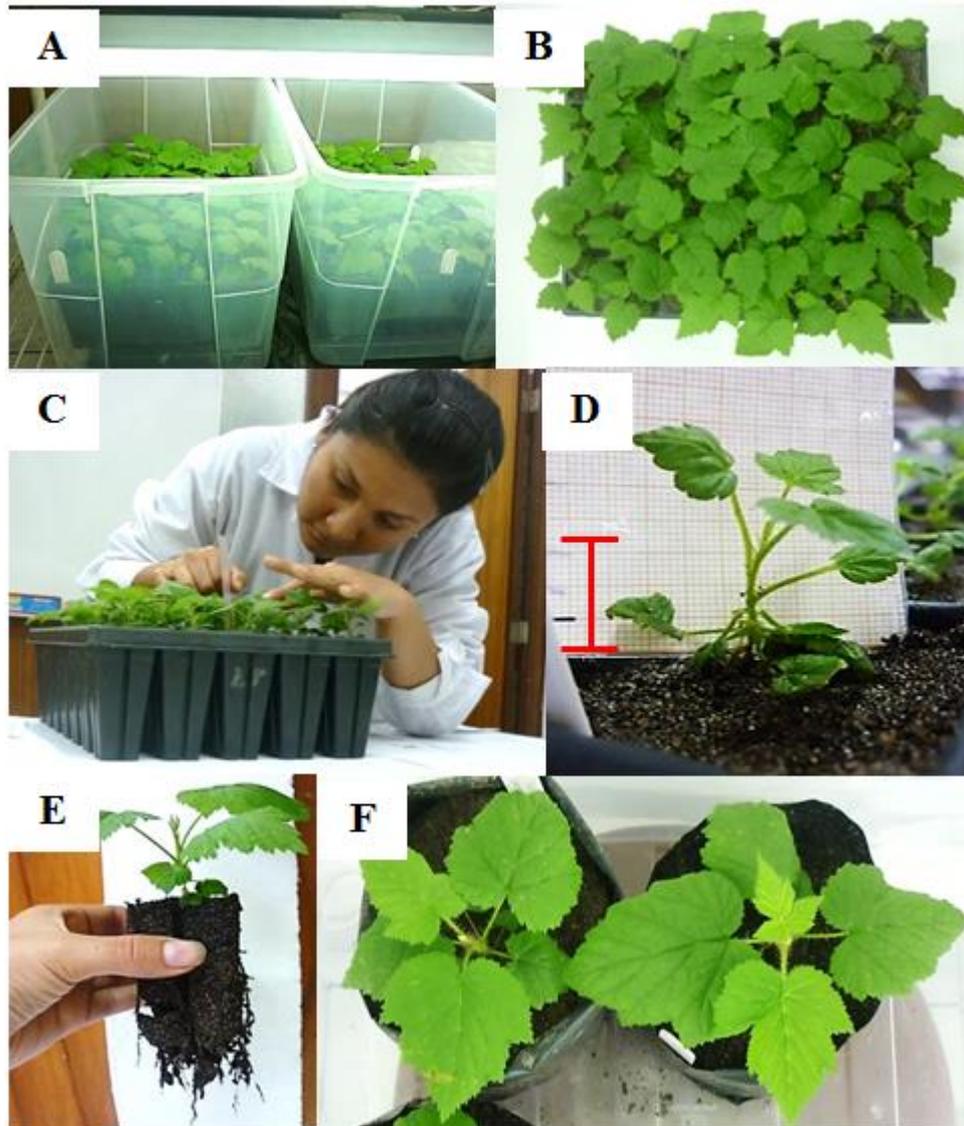
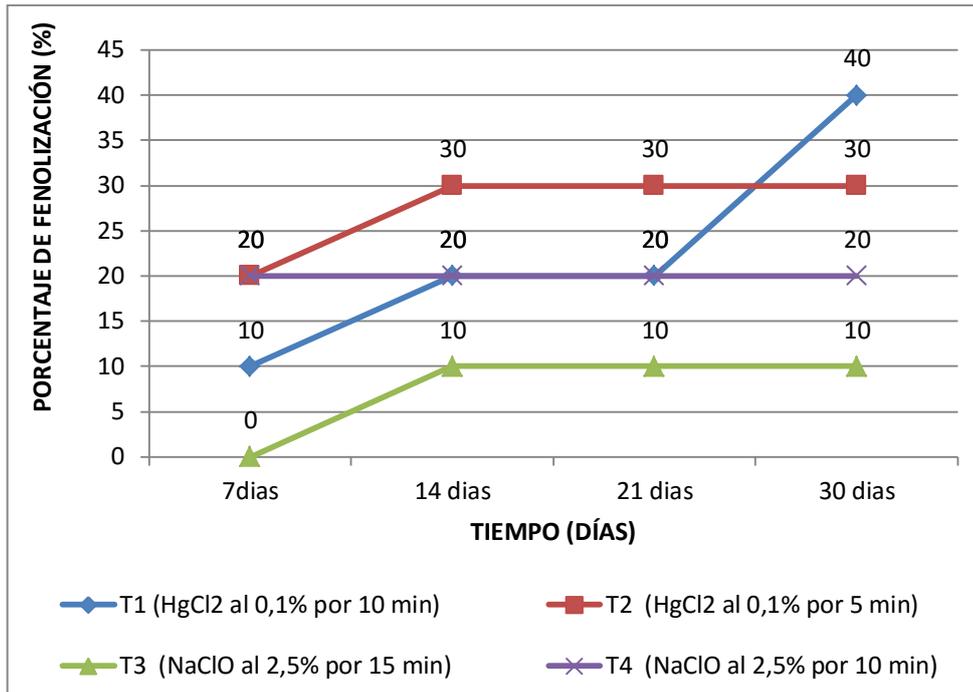
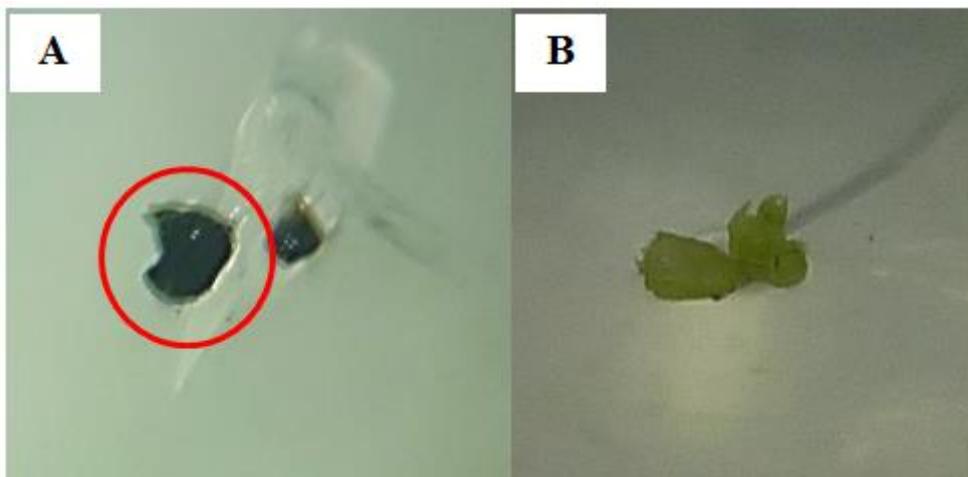


Figura 19. A y B. Plántulas aclimatadas en cámara de aclimatación. C y D. Evaluación del crecimiento de las plántulas. E y F. Transferencia de plántulas en bolsas con sustrato



**Figura 20. Porcentaje (%) de fenolización de ápices meristemáticos según tratamientos de esterilización**



**Figura 21. Ápices meristemáticos: A. Necrosado (muerto) B. Vivo**

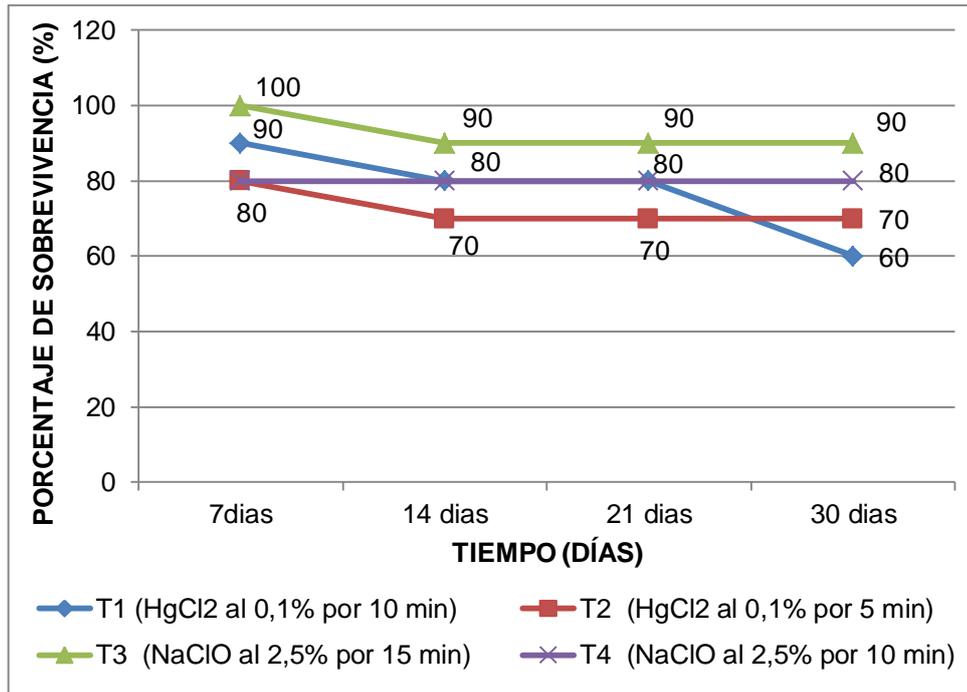


Figura 22. Porcentaje (%) de sobrevivencia de ápices meristemáticos según tratamientos de esterilización

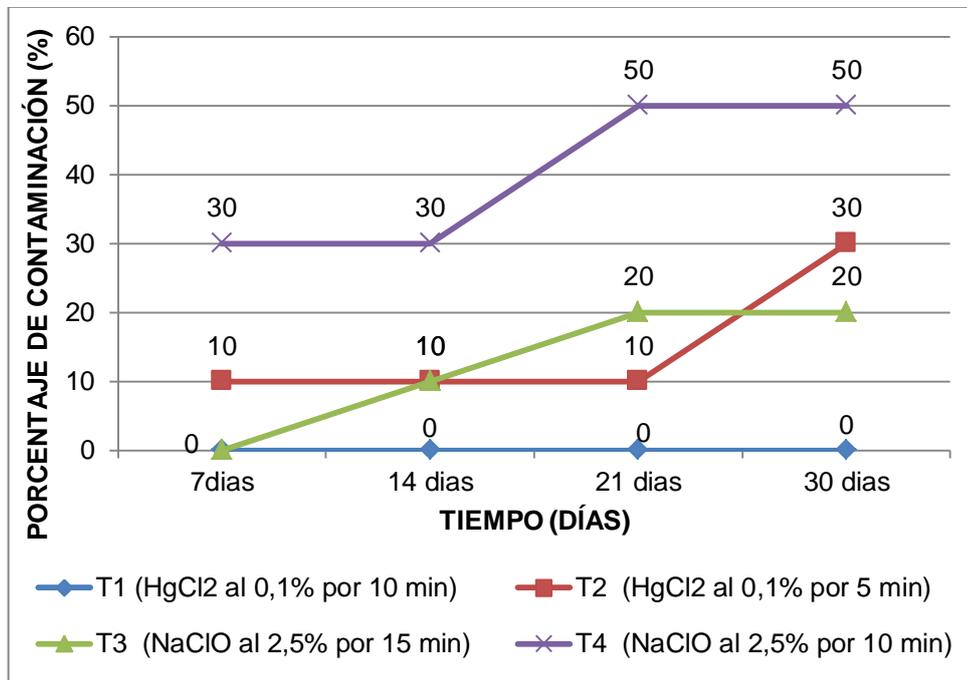


Figura 23. Porcentaje (%) de contaminación de miniestacas según tratamientos de esterilización

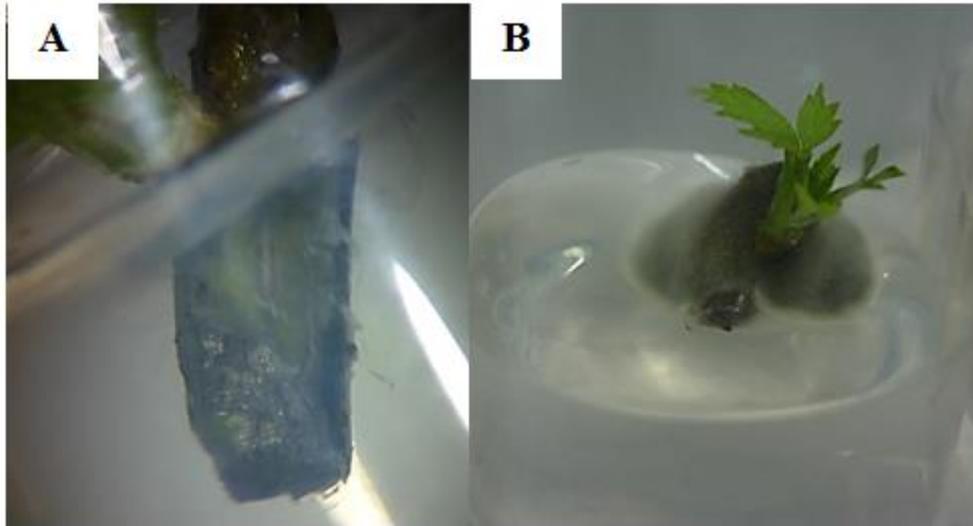


Figura 24. Miniestacas contaminadas: A. Por bacterias. B. Por hongos.

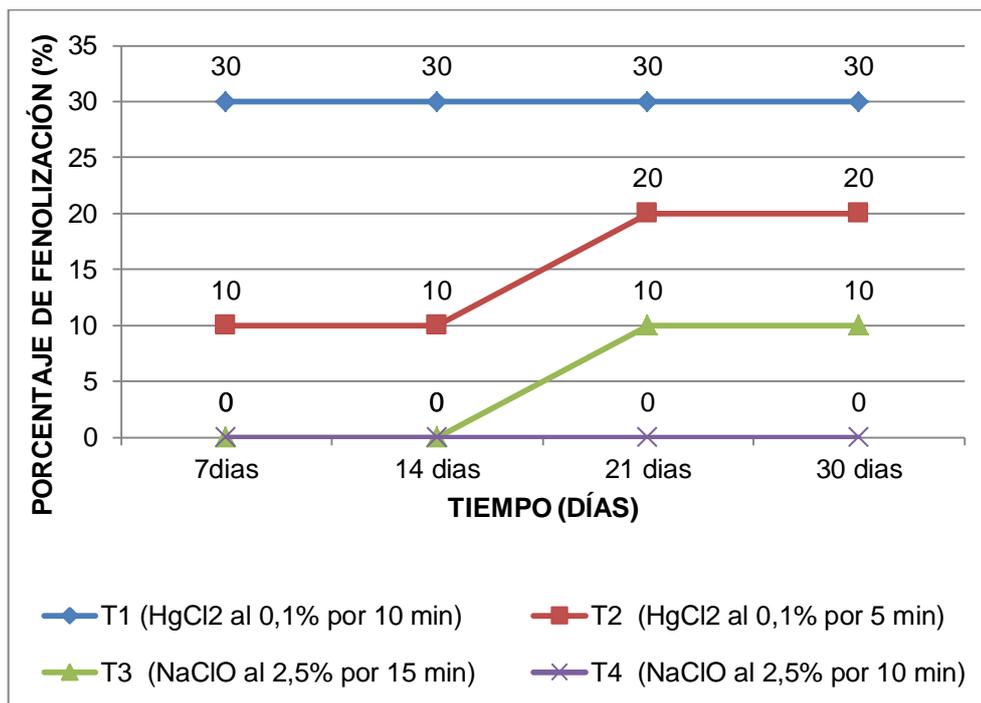


Figura 25. Porcentaje de fenolización (%) de miniestacas según tratamientos de la esterilización



Figura 26. A. Miniestaca fenolizada

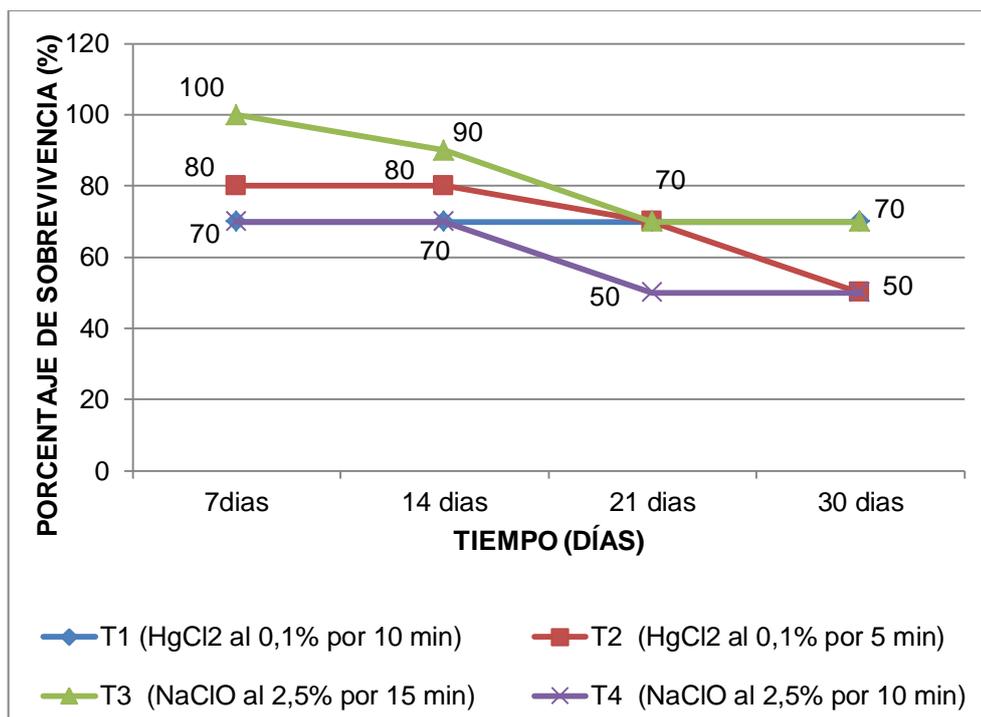
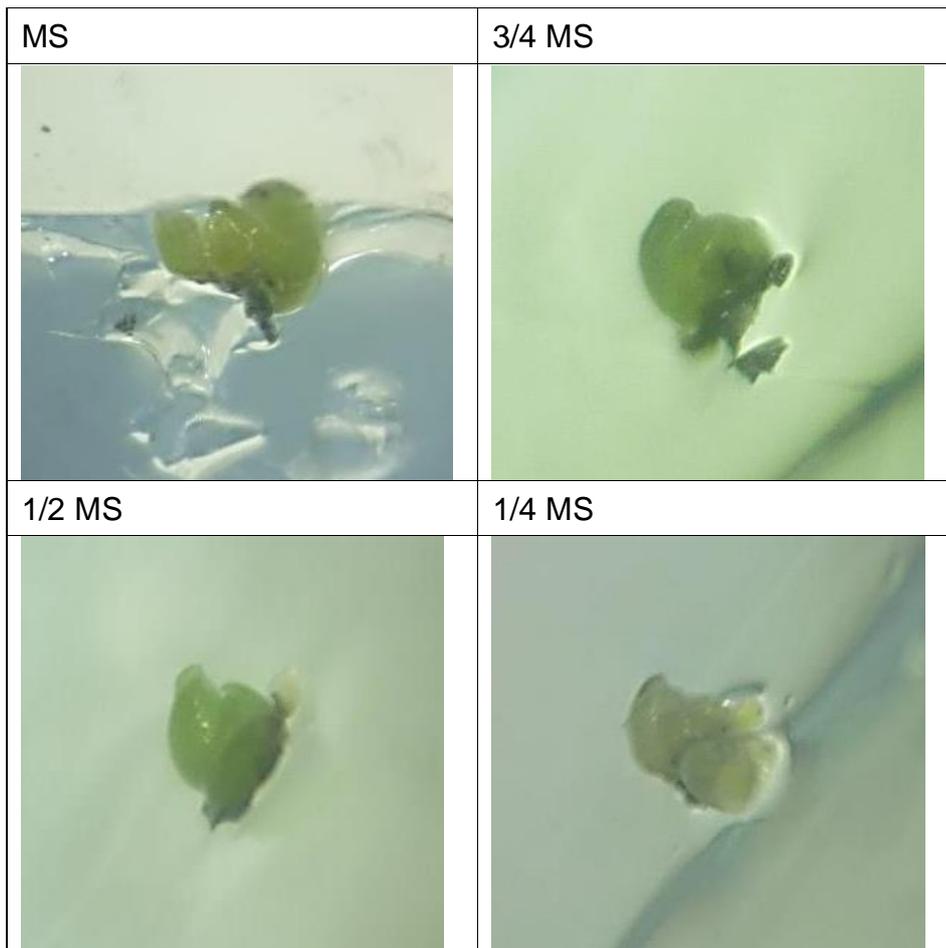
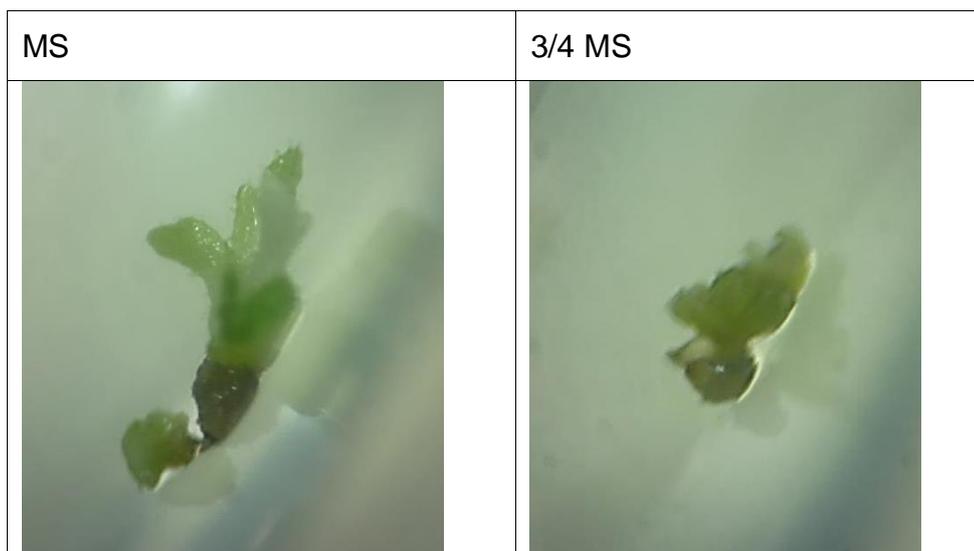


Figura 27. Porcentaje de sobrevivencia (%) de miniestacas según tratamientos de esterilización



**Figura 28. Ápices meristemáticos en desarrollo a diferente concentración de MS a los 30 días**



**Figura 29 Ápices meristemáticos con hojas desarrolladas a los 50 días.**

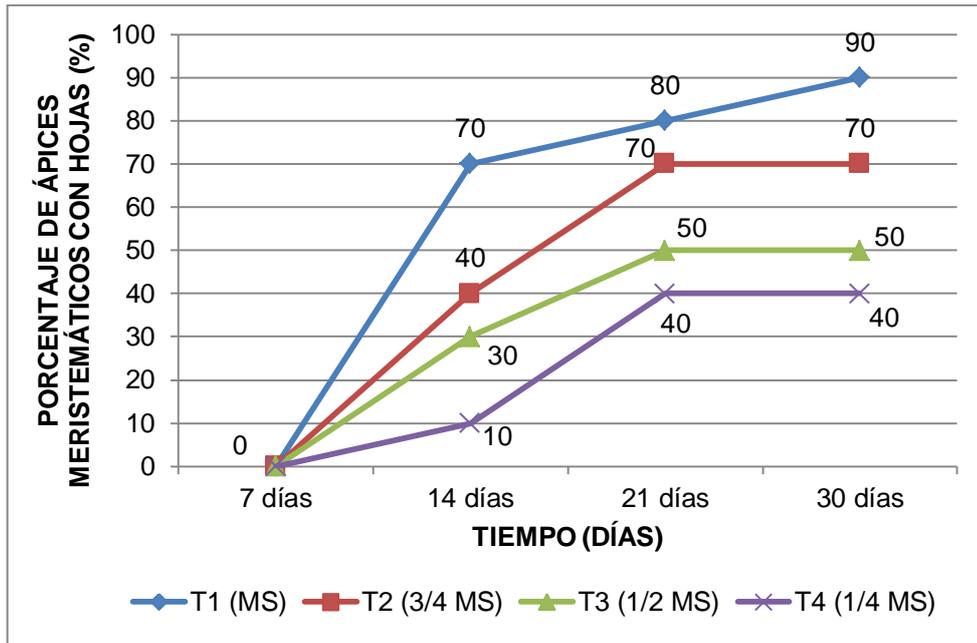


Figura 30. Porcentaje (%) de ápices meristemáticos con hojas a diferente concentración de sales MS

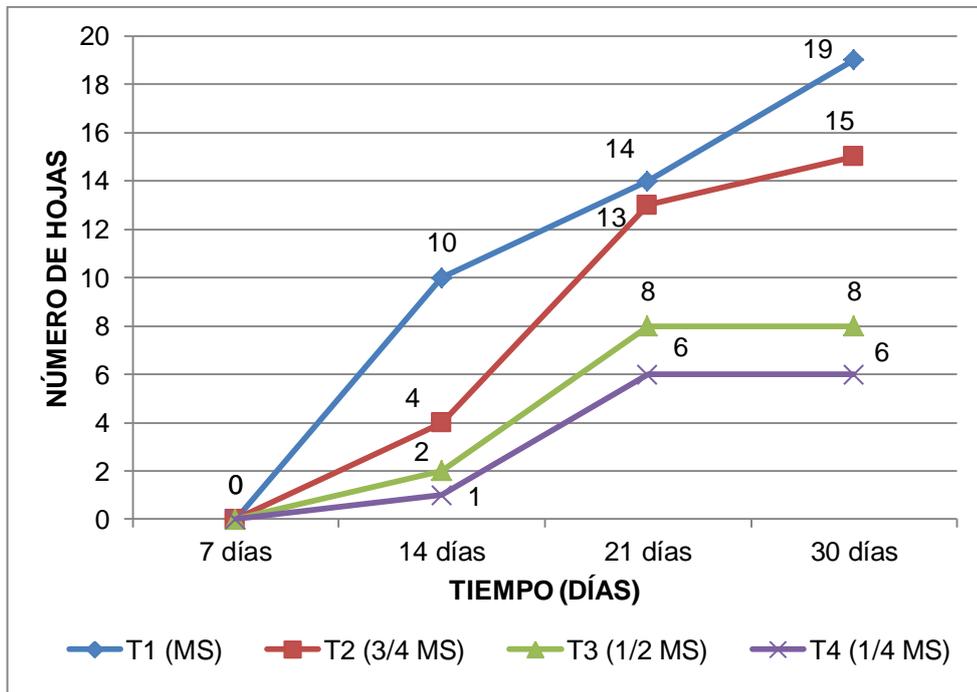


Figura 31. Número de hojas de ápices meristemáticos a diferente concentración de sales MS

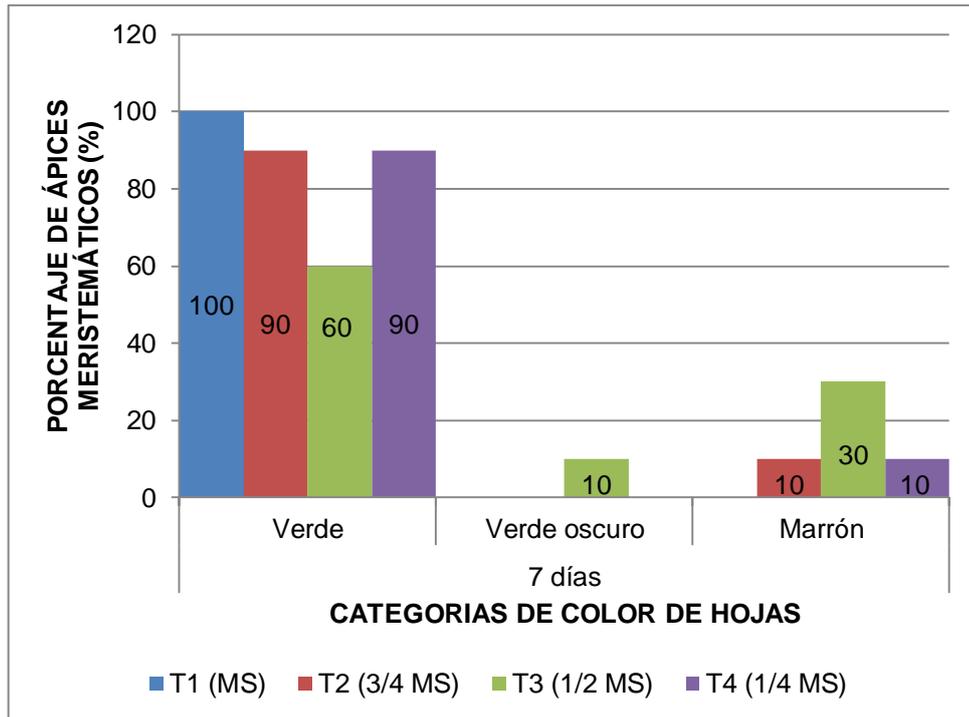


Figura 32. Porcentaje (%) de ápices meristemáticos por categorías de color de hojas según tratamientos a los 7 días.

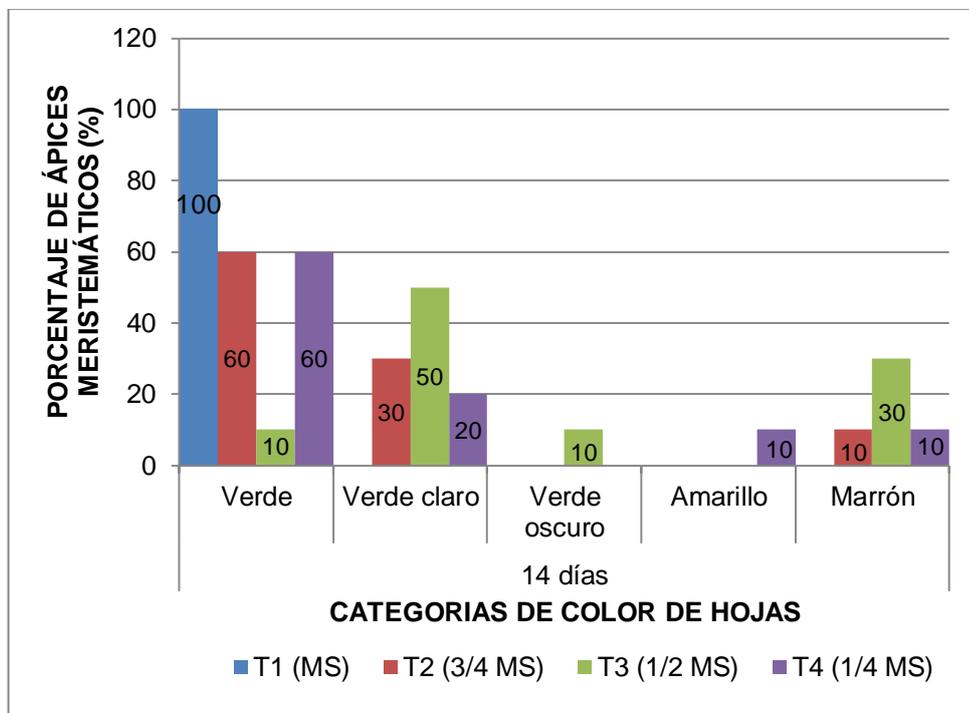


Figura 33. Porcentaje (%) de ápices meristemáticos por categorías de color de hojas según tratamientos a los 14 días.

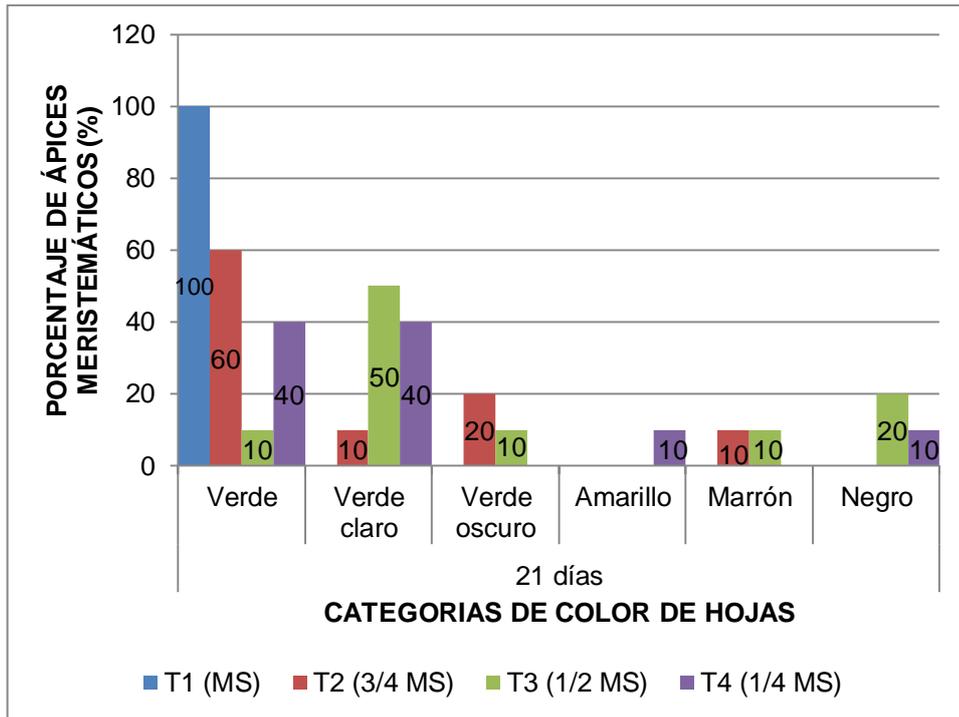


Figura 34. Porcentaje (%) de ápices meristemáticos por categorías de color de hojas según tratamientos a los 21 días.

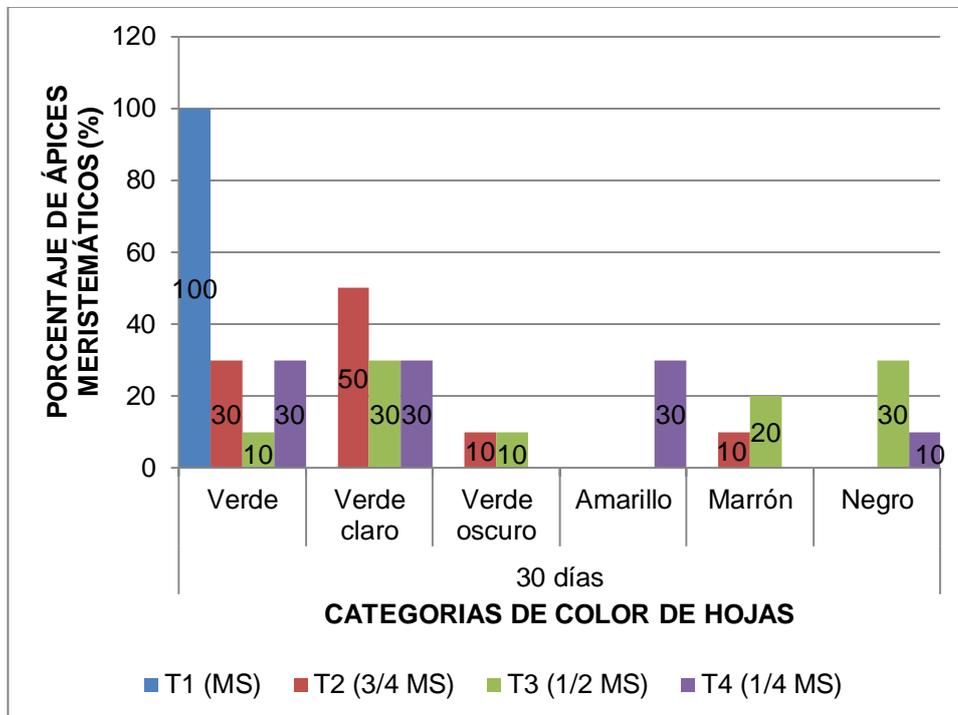


Figura 35. Porcentaje (%) de ápices meristemáticos por categorías de color de hojas según tratamientos a los 30 días.

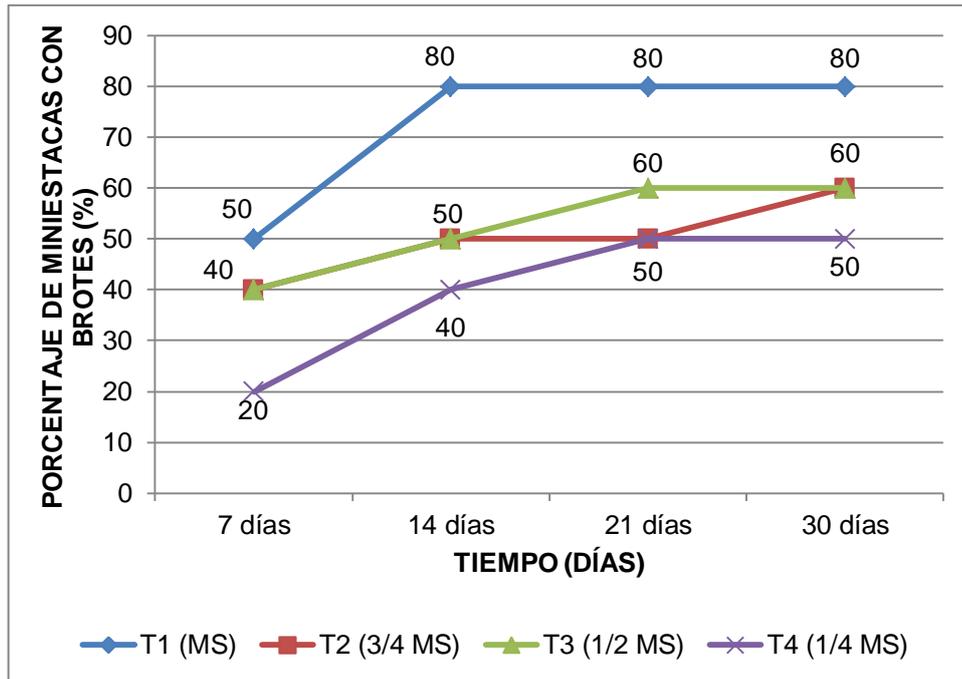


Figura 36. Porcentaje (%) de miniestacas con brotes según tratamientos para determinar la concentración de sales MS del medio de iniciación

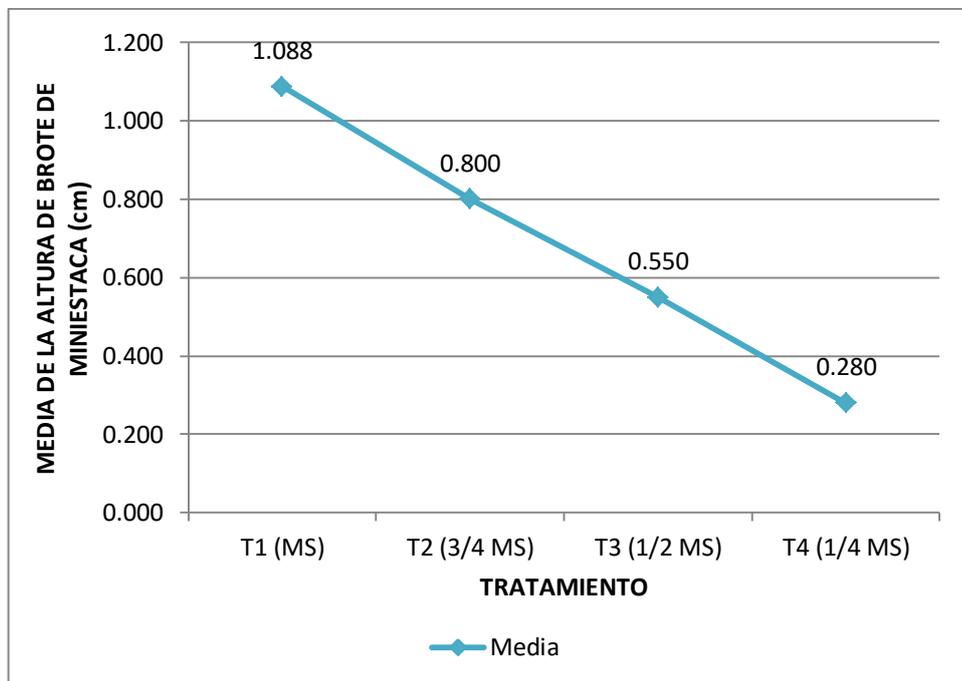


Figura 37. Media de la altura de brote (cm) según tratamientos para determinar la concentración de sales MS del medio de iniciación a los 30 días.

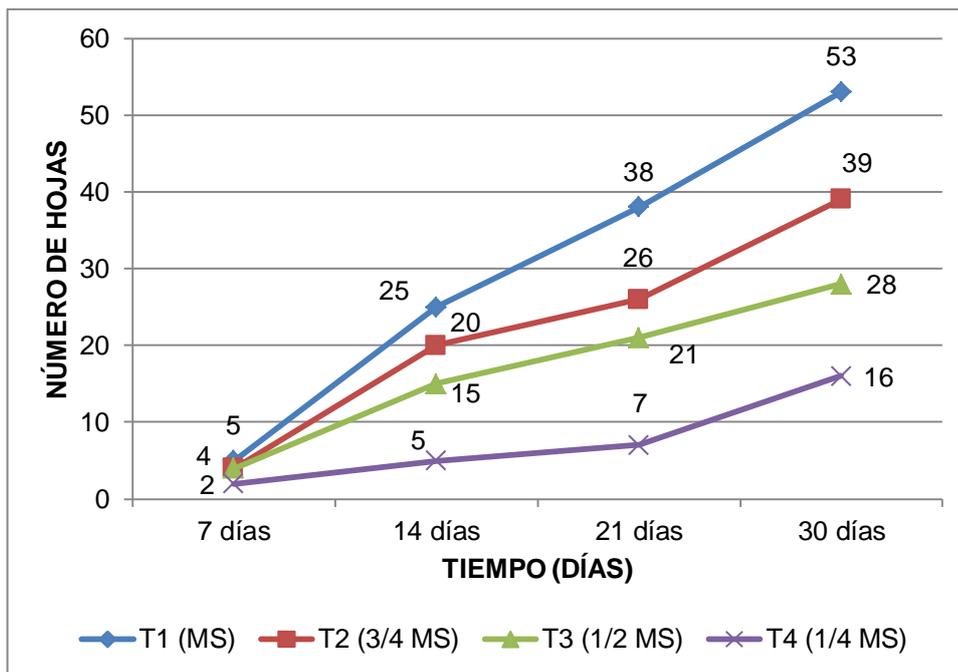


Figura 38. Número de hojas de miniestacas a diferente concentración de sales MS

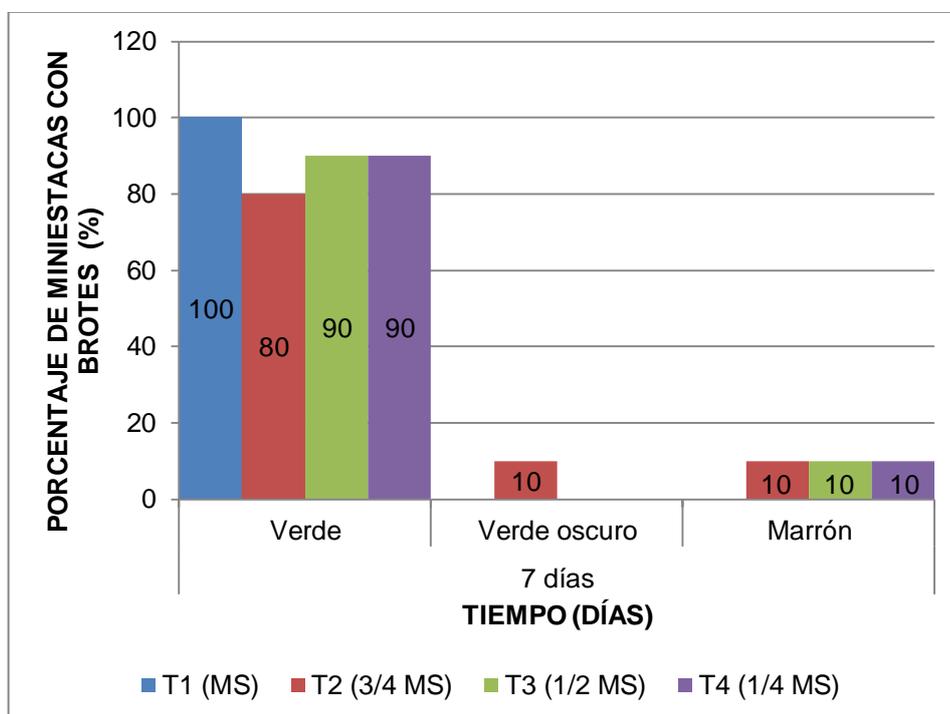


Figura 39. Porcentaje (%) de miniestacas por categorías de color de hojas según tratamientos a los 7 días.

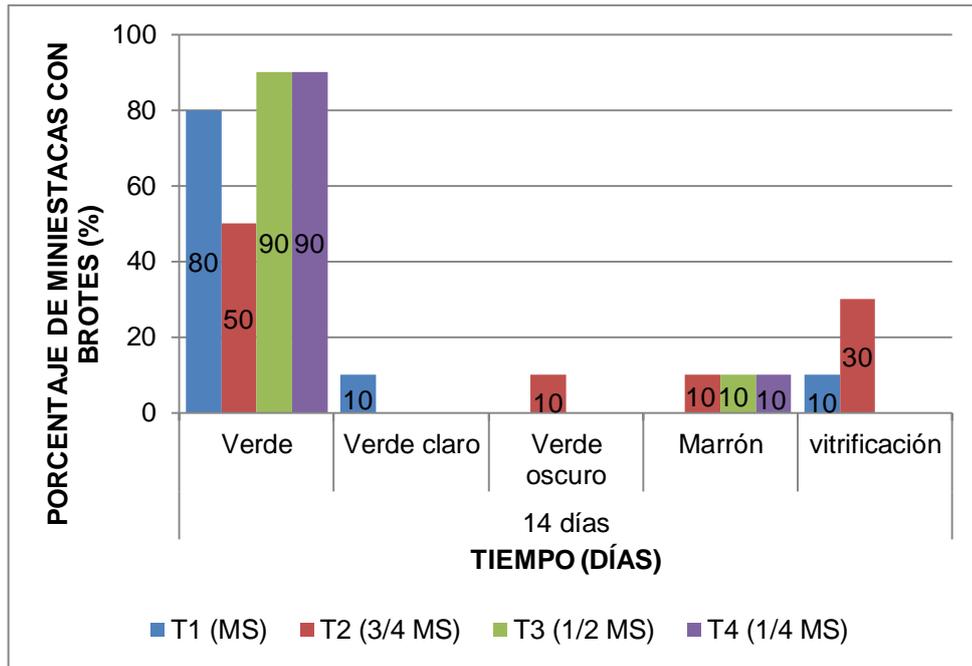


Figura 40. Porcentaje (%) de miniestacas por categorías de color de hojas según tratamientos a los 14 días.

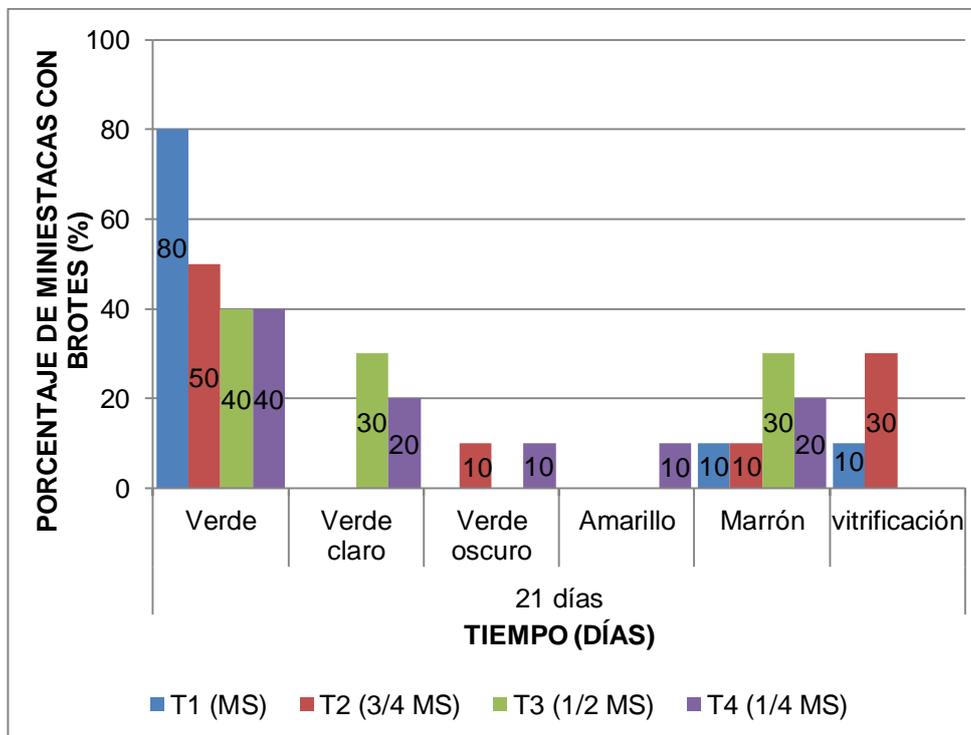


Figura 41. Porcentaje (%) de miniestacas por categorías de color de hojas según tratamientos a los 21 días.

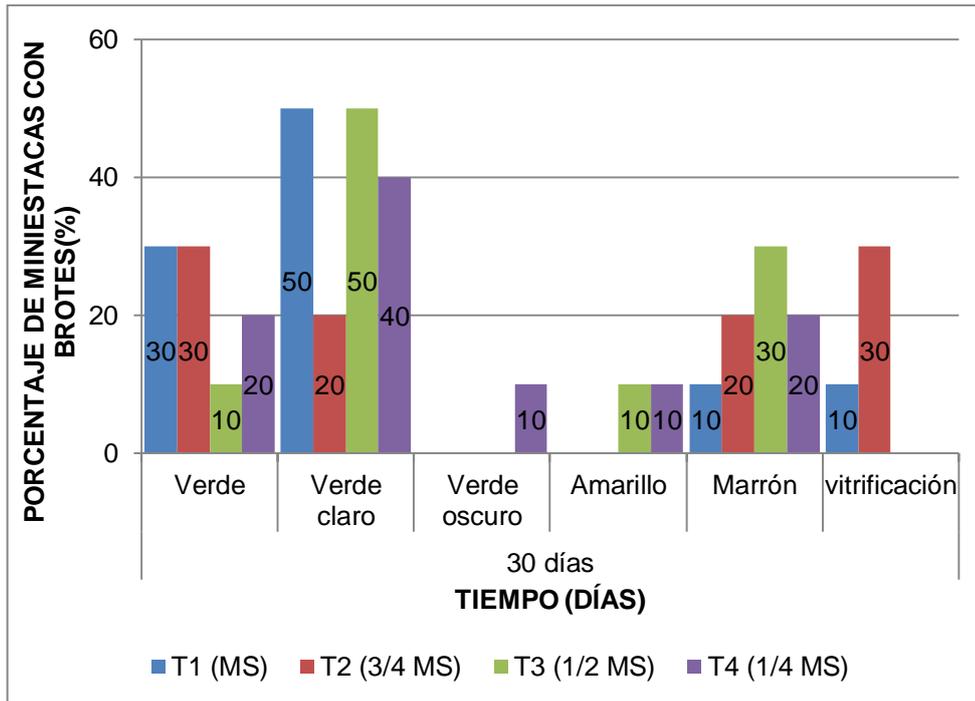
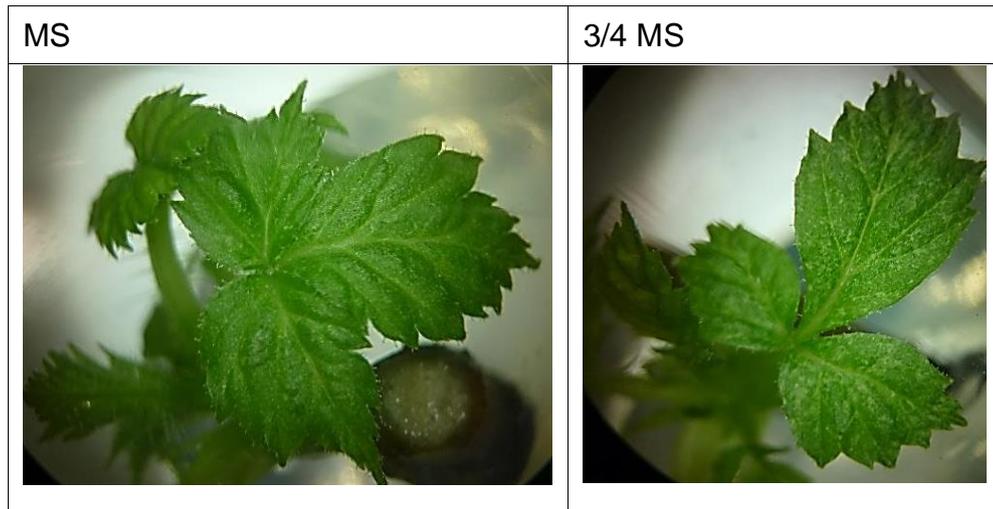


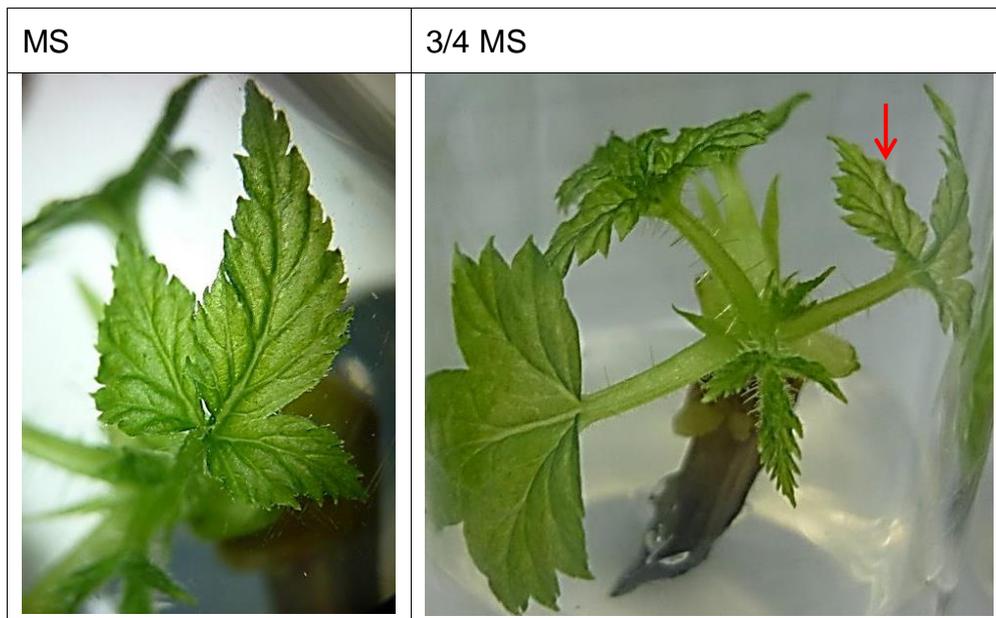
Figura 42. Porcentaje (%) de miniestacas por categorías de color de hojas según tratamientos a los 30 días.



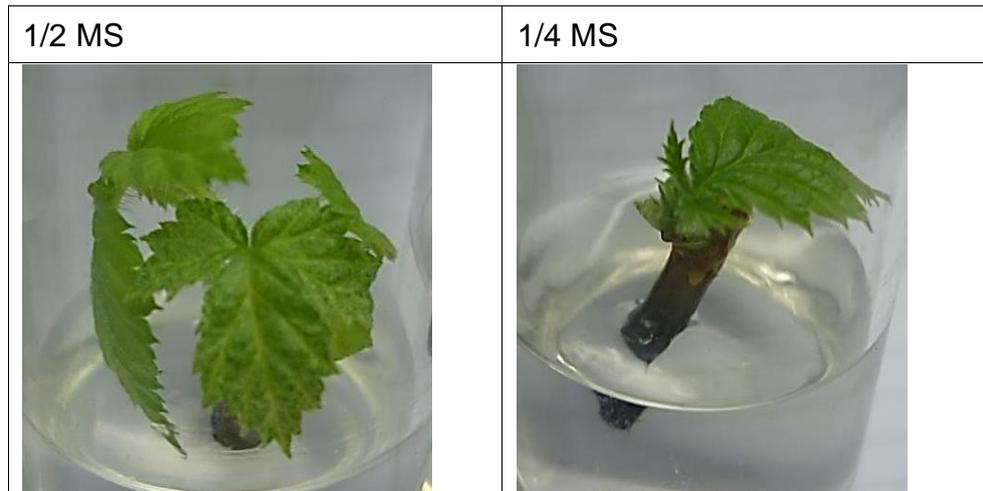
Figura 43. Brotes con hojas en miniestaca *in vitro* en MS a los 7 días



**Figura 44. A y B. Brotes con hojas en miniestacas a los 14 días.**



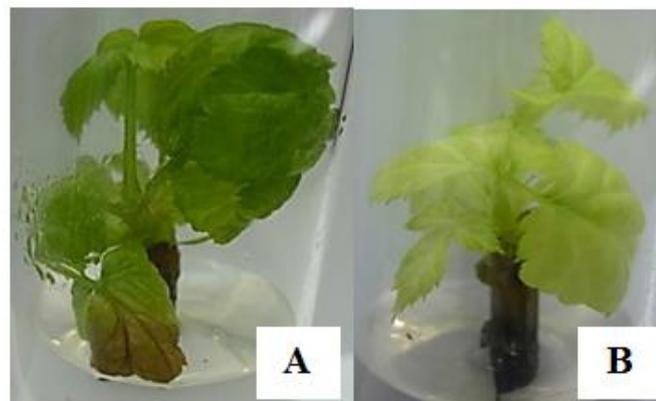
**Figura 45. A y B. Brotes con hojas vitrificadas en miniestacas a los 14 días.**



**Figura 46. A y B. Brotes con hojas en miniestacas a los 21 días.**



**Figura 47. A y B. Brotes con hojas en miniestacas en medio con sales completa de MS a los 30 días.**



**Figura 48. Brotes con hojas en miniestacas en medio con 3/4 de sales MS a los 30 días. A. Verde claro. B. Amarillo.**

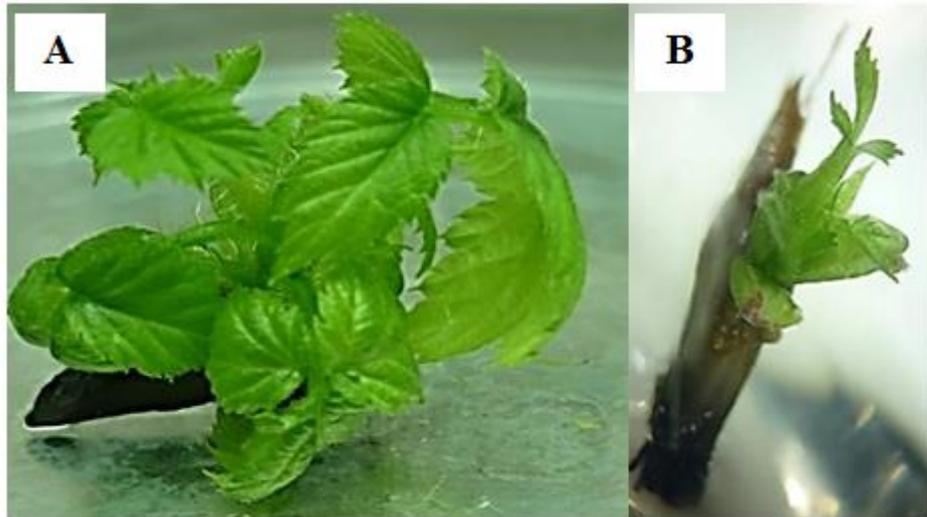


Figura 49. Brotes con hojas en miniestacas en medio con 1/2 de sales MS a los 30 días. A. Verde. B. Yema sin desarrollo de brote.



Figura 50. Brotes con hojas en miniestacas en medio con 1/4 de sales MS a los 30 días. A. Verde claro. B. Yema sin desarrollo de brote.

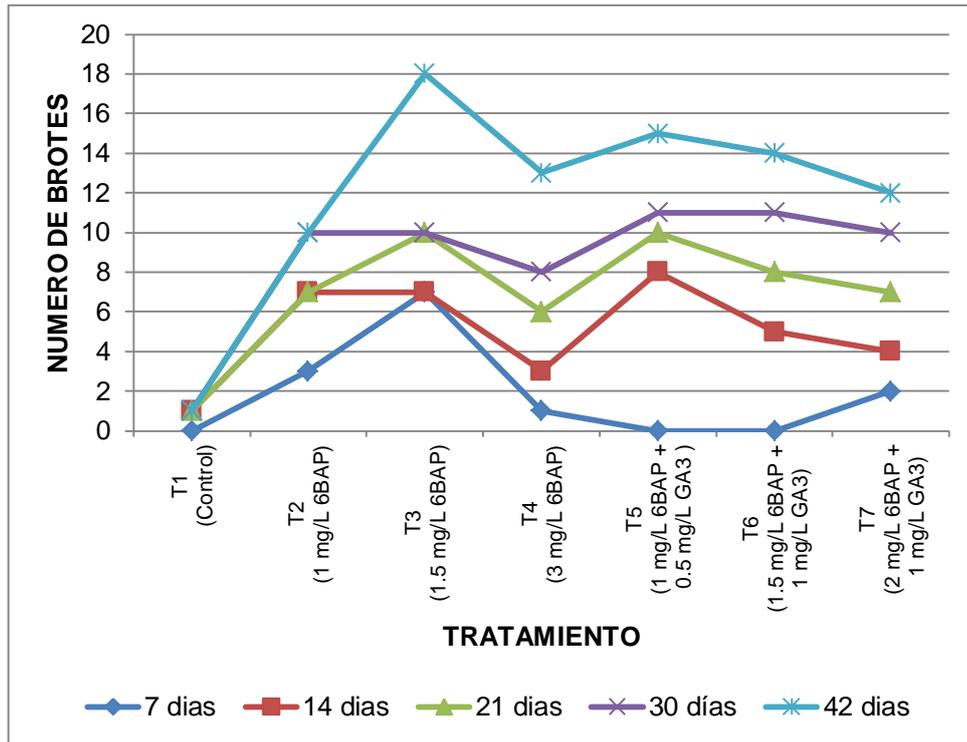


Figura 51. Número de brotes según tratamiento en la multiplicación de segmentos apicales *in vitro*

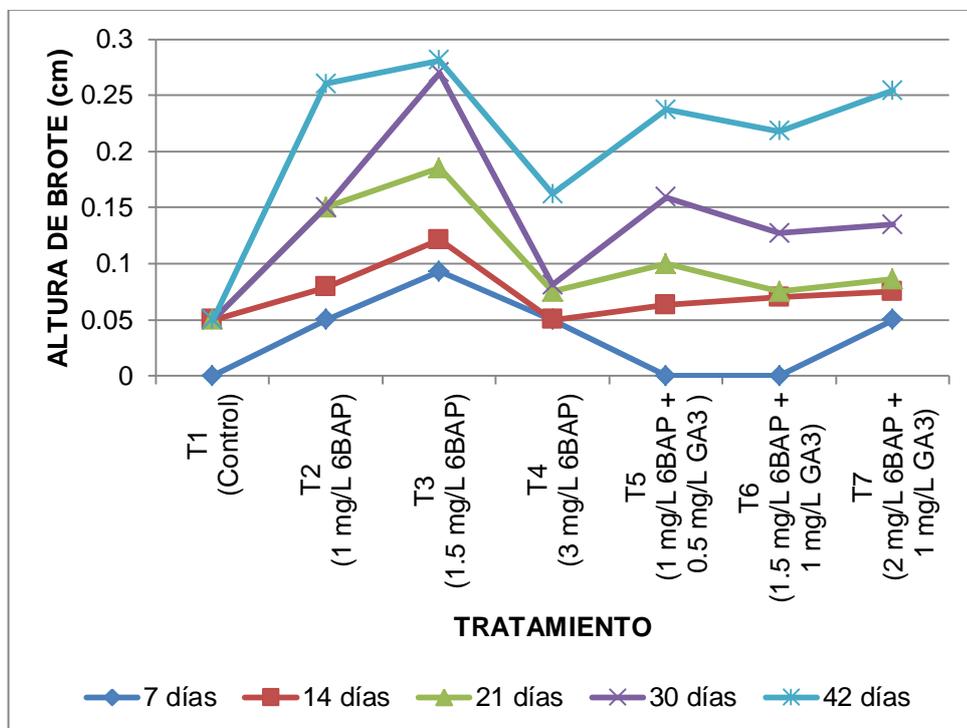
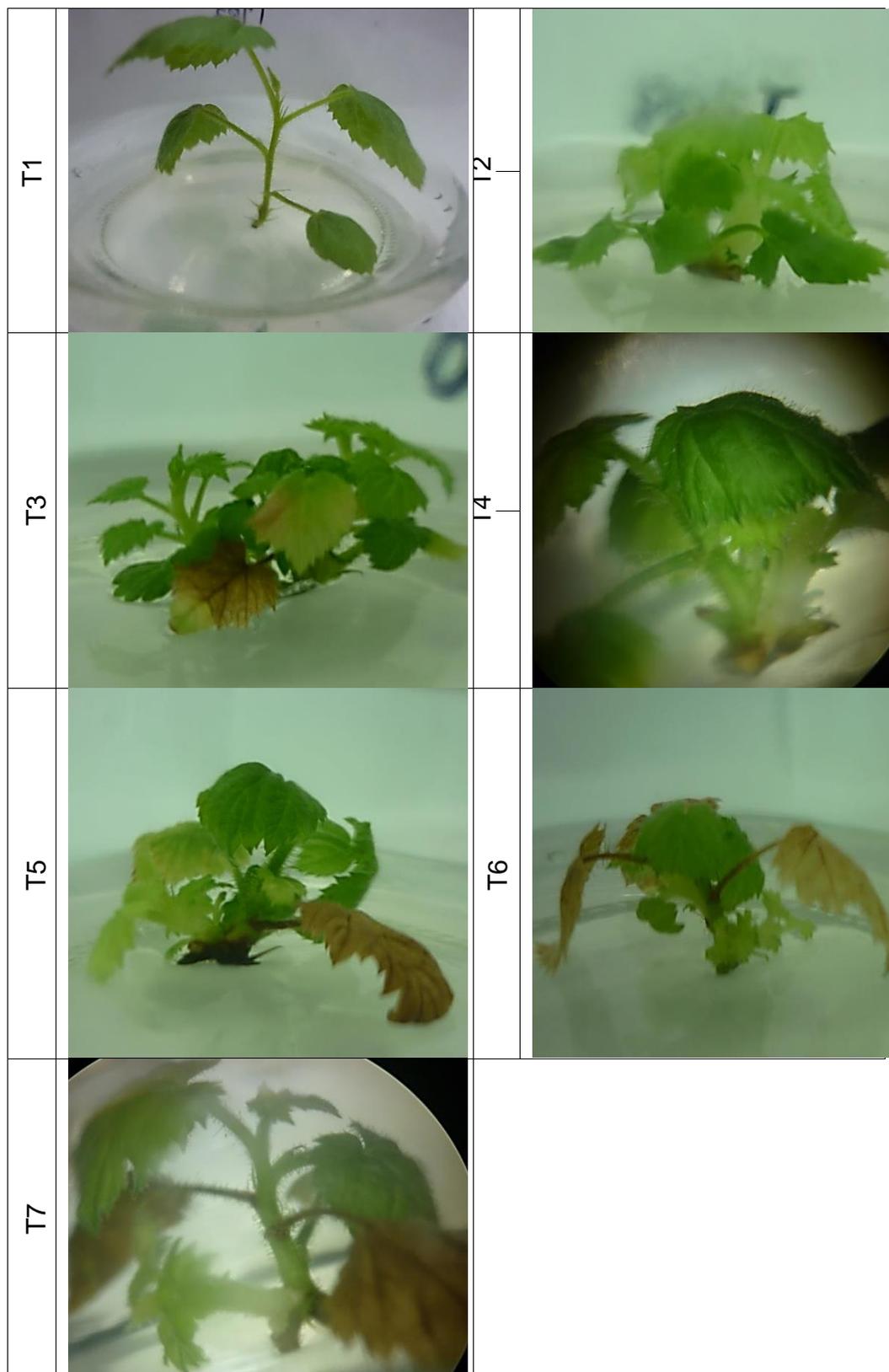


Figura 52. Media de altura de brotes según tratamiento en la multiplicación de segmentos apicales *in vitro*



**Figura 53. Desarrollo de brotes a partir de segmentos apicales según tratamiento de multiplicación**

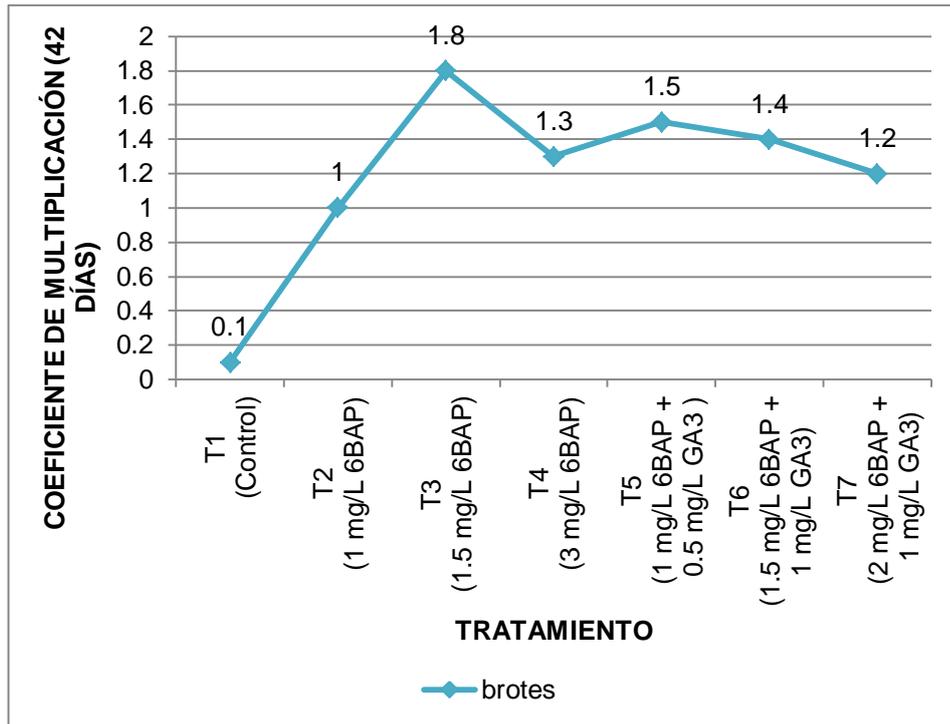


Figura 54. Coeficiente de multiplicación según tratamiento en la multiplicación de segmentos apicales *in vitro*

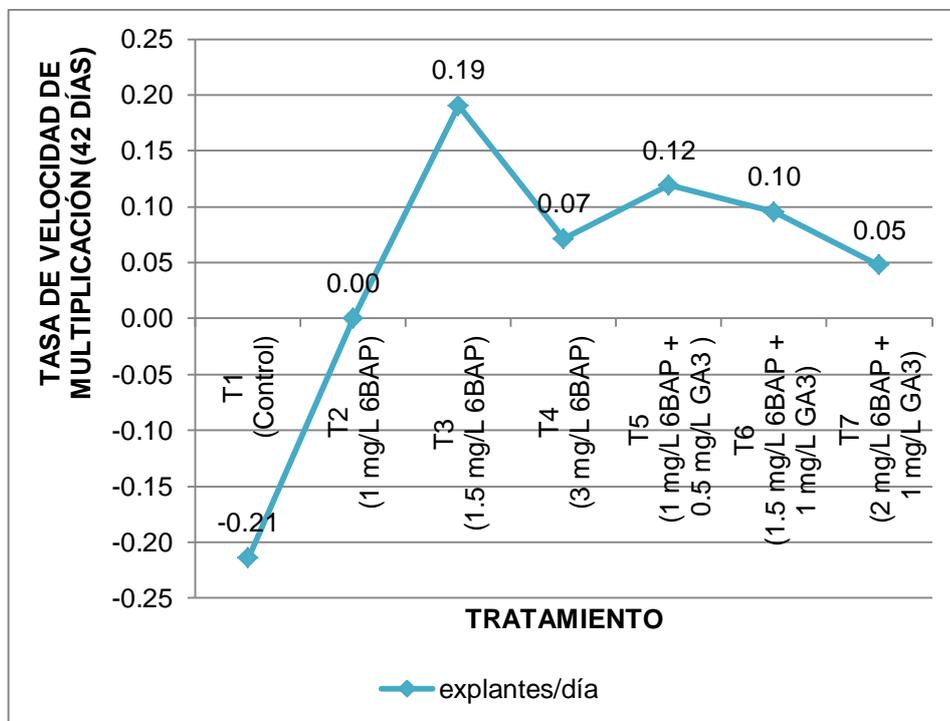


Figura 55. Tasa de velocidad de multiplicación según tratamiento en la multiplicación de segmentos apicales *in vitro*

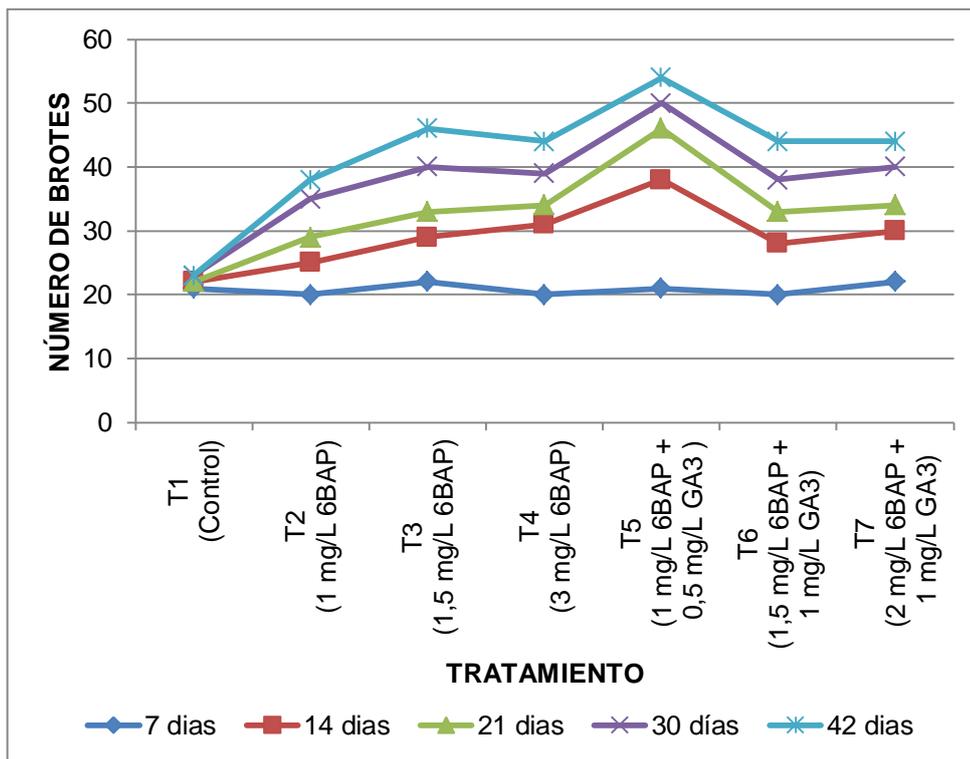


Figura 56. Número de brotes según tratamiento en la multiplicación de miniestacas *in vitro*

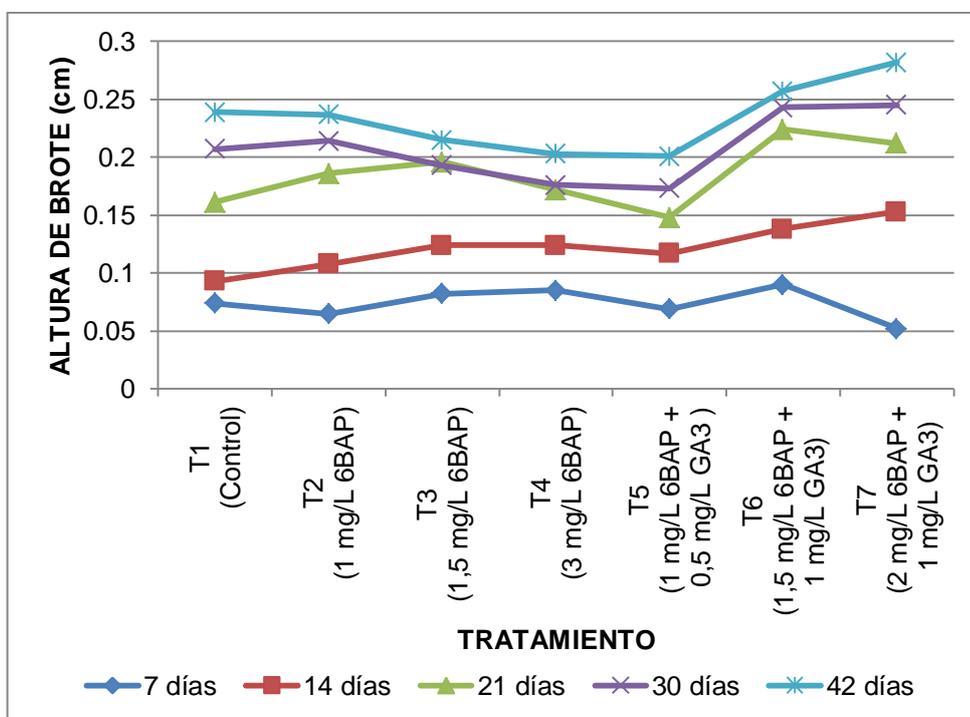
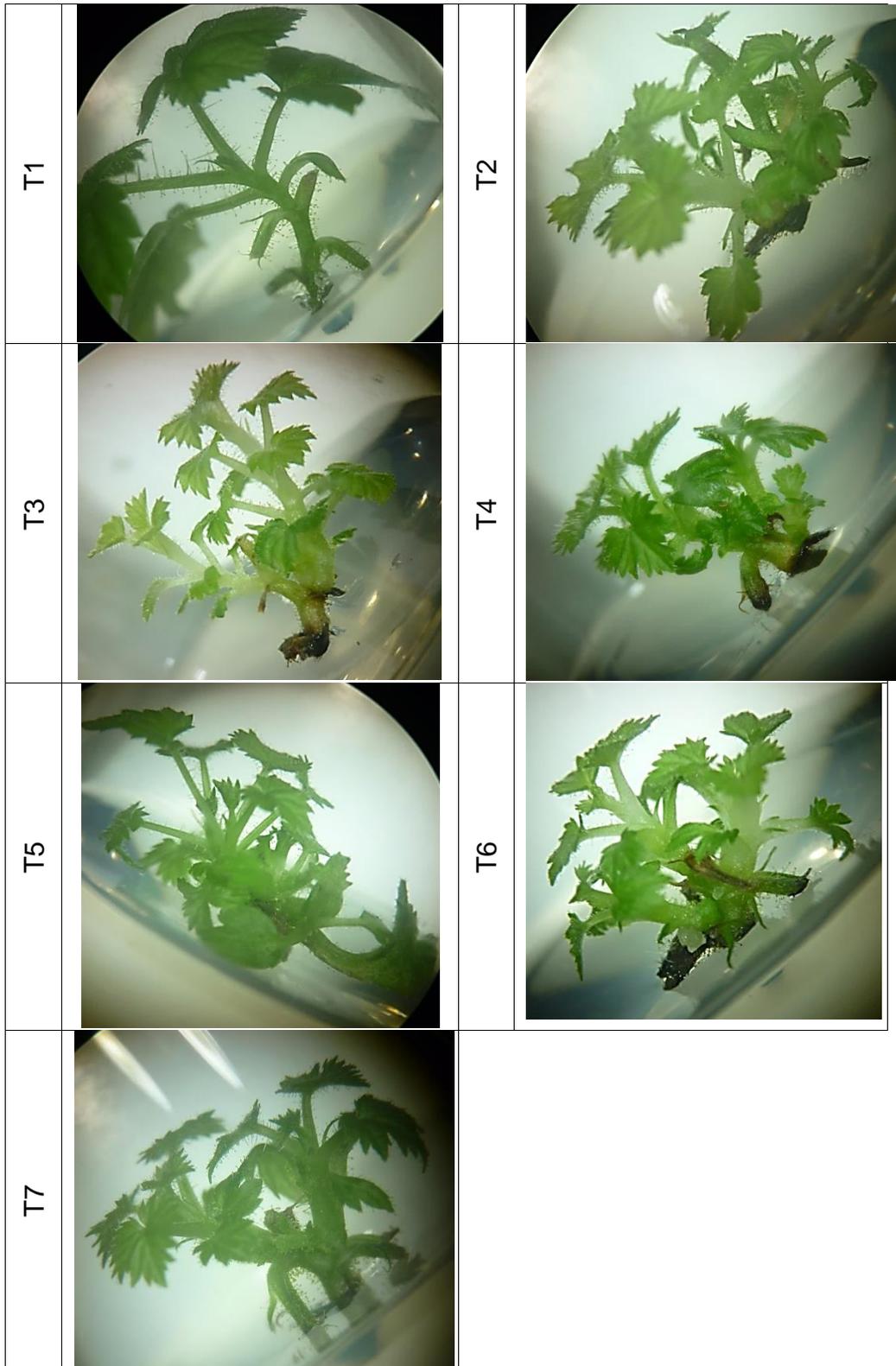


Figura 57. Media de altura de brotes según tratamiento en la multiplicación de miniestacas *in vitro*



**Figura 58. Desarrollo de brotes a partir miniestacas según tratamiento de multiplicación**

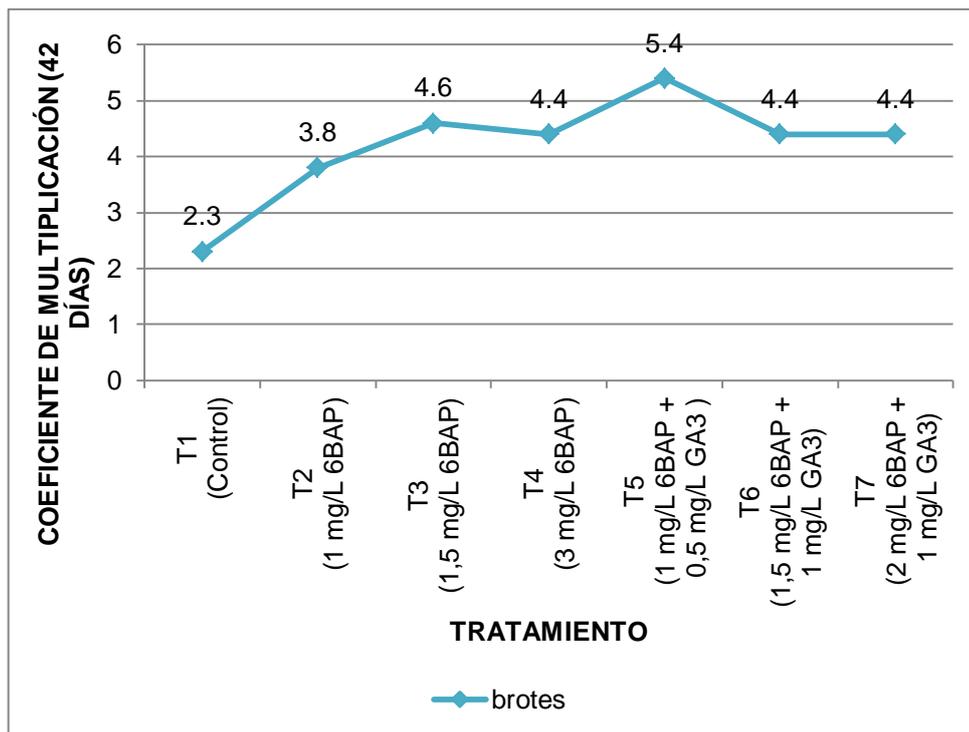


Figura 59. Coeficiente de multiplicación según tratamiento en la multiplicación de miniestacas *in vitro*

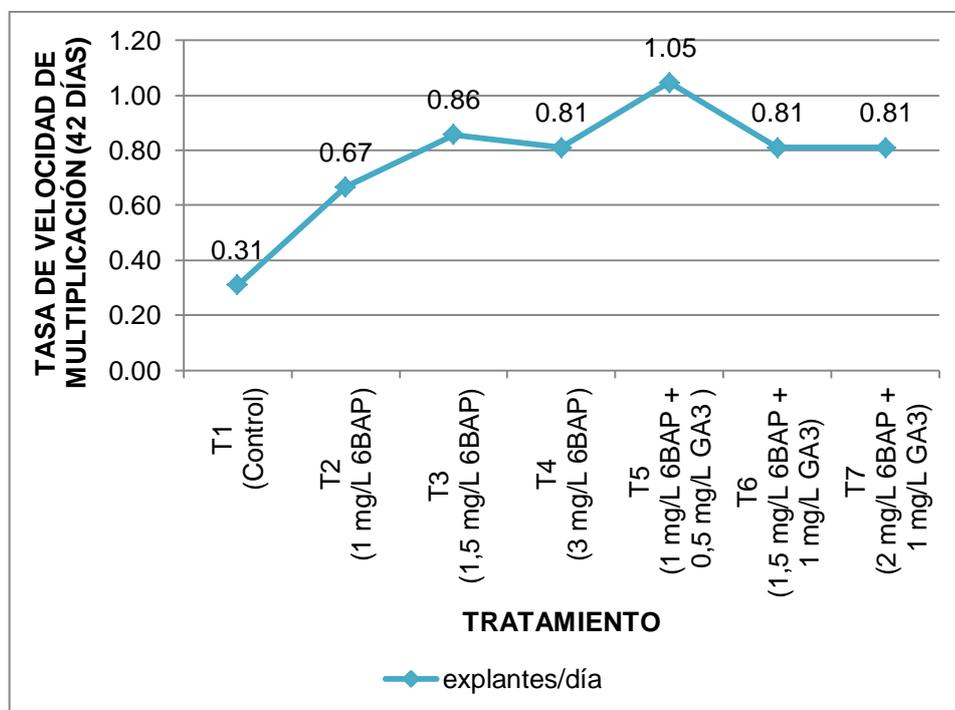


Figura 60. Tasa de velocidad de multiplicación según tratamiento en la multiplicación de miniestacas *in vitro*

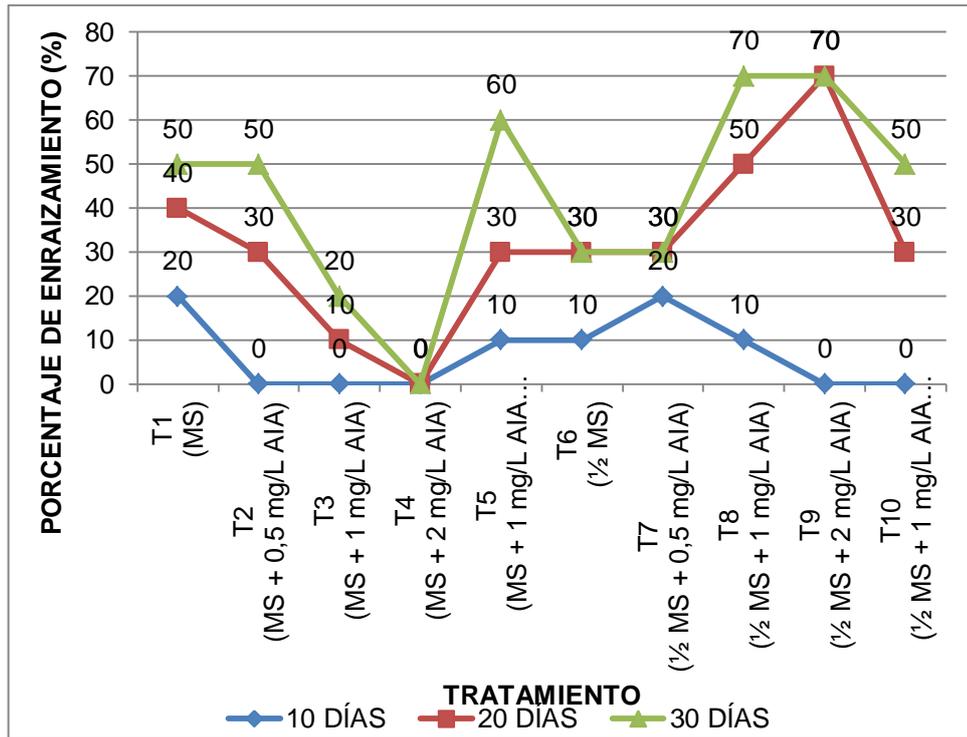


Figura 61. Porcentaje de enraizamiento a diferente concentración de auxina

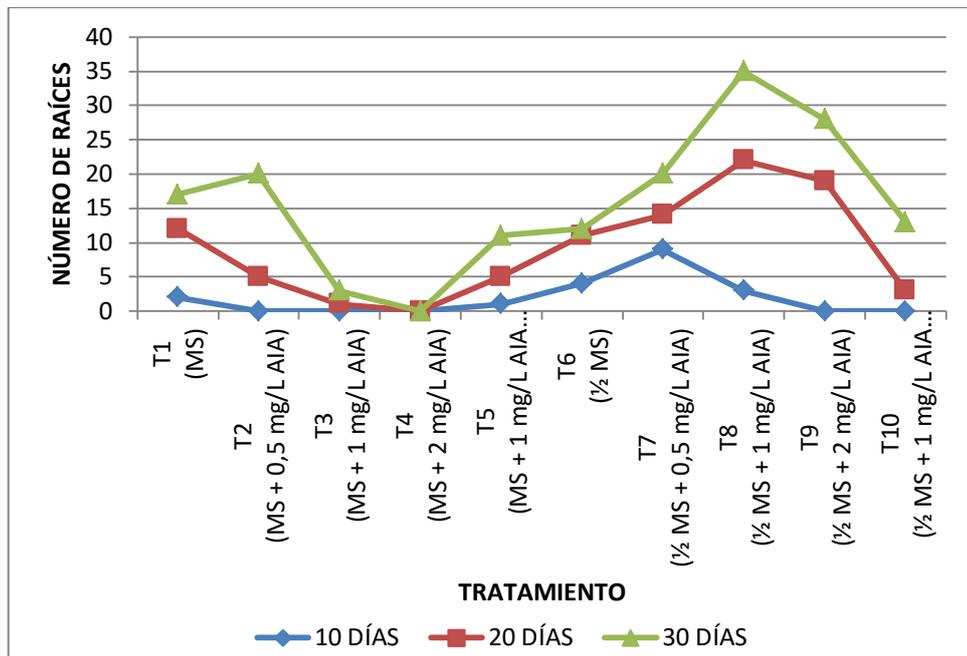


Figura 62. Número de raíces a diferente concentración de auxina

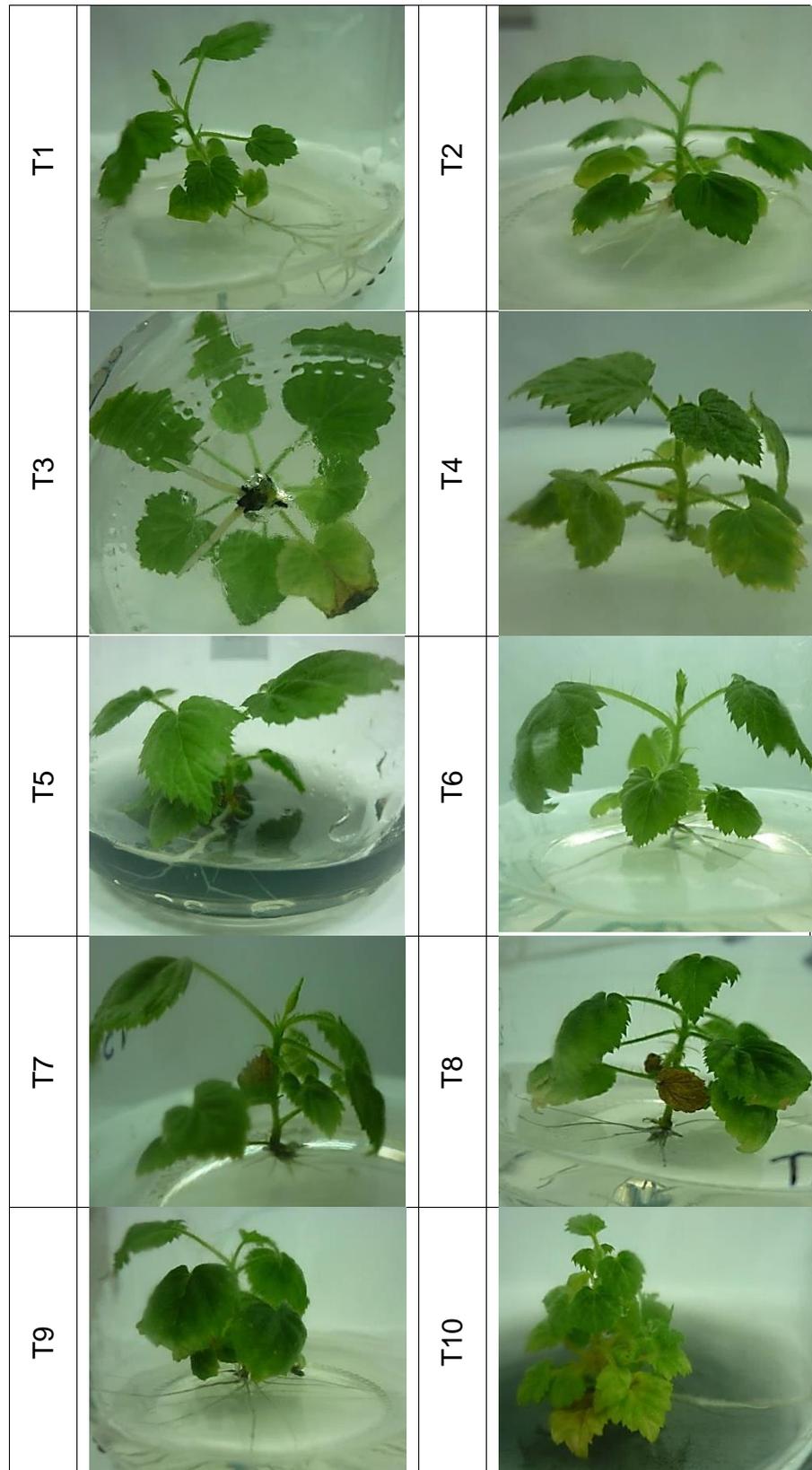


Figura 63. Enraizamiento de plántulas *in vitro* según tratamiento

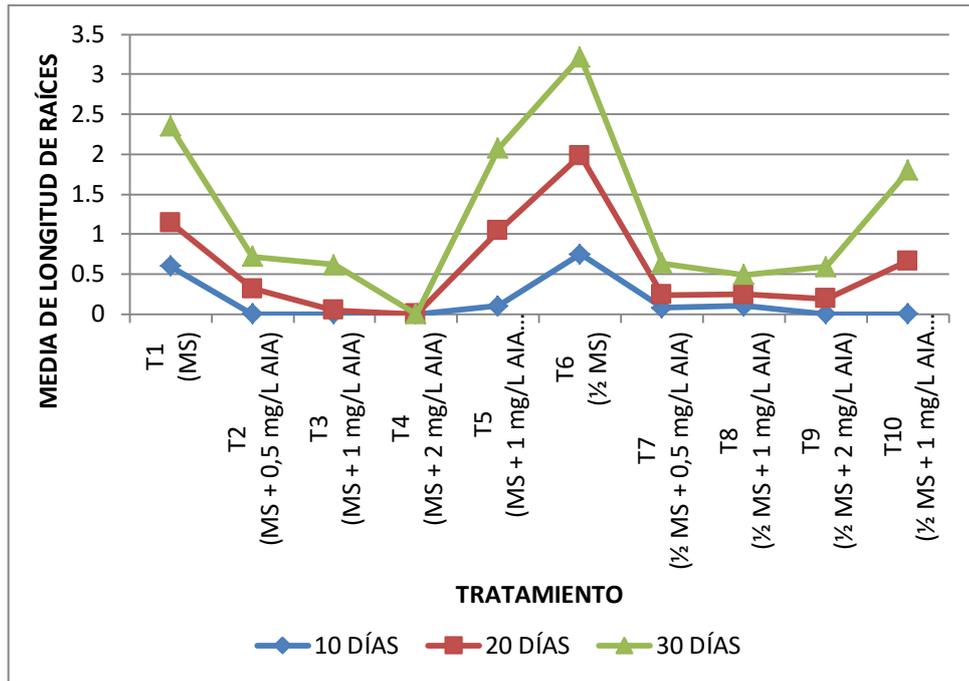


Figura 64. Media de la longitud de raíces a diferente concentración de auxina

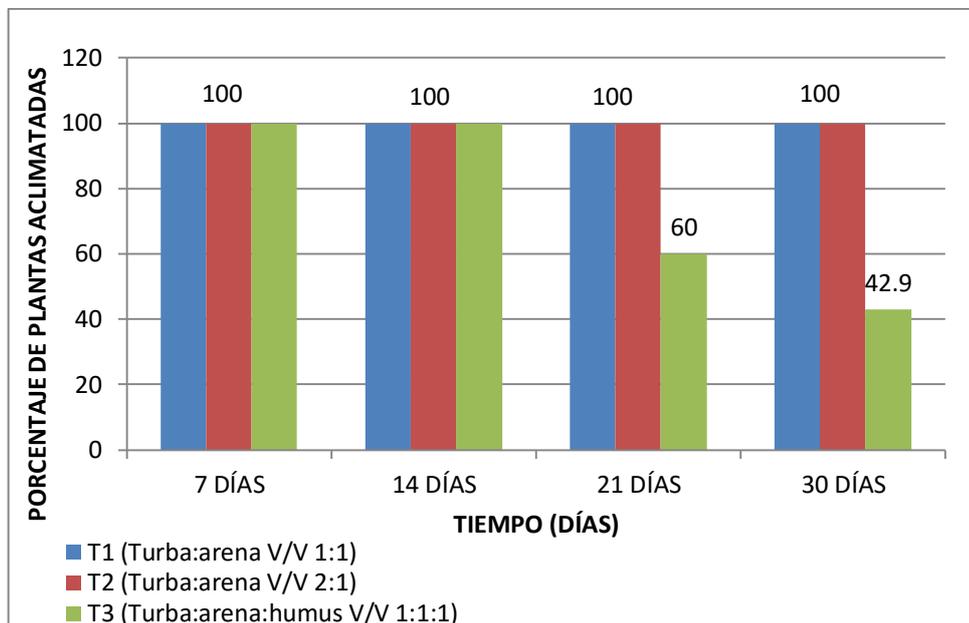
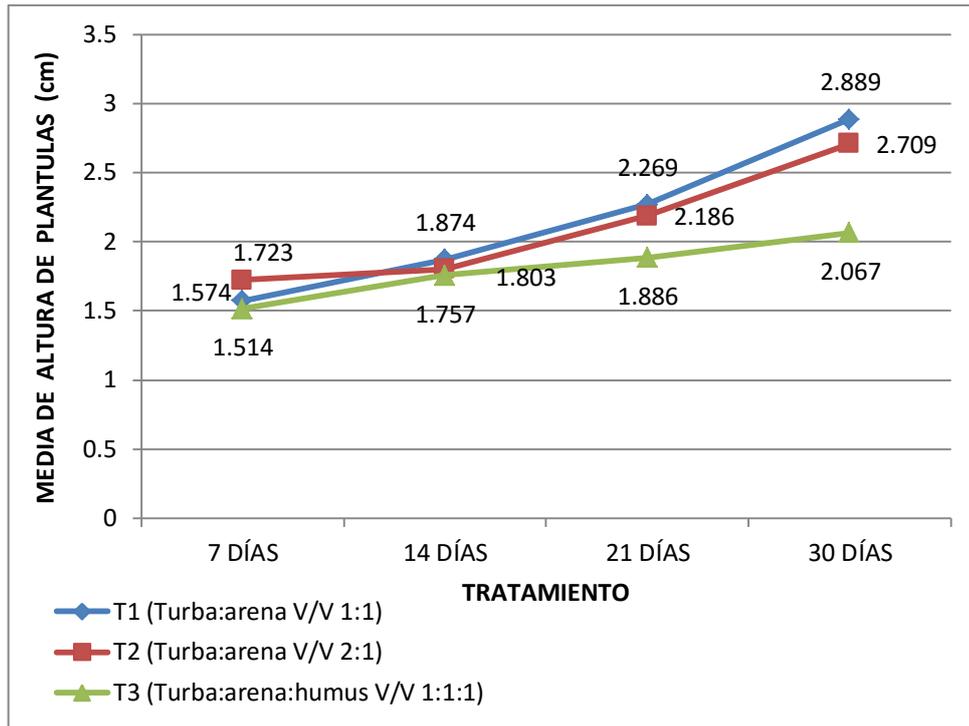
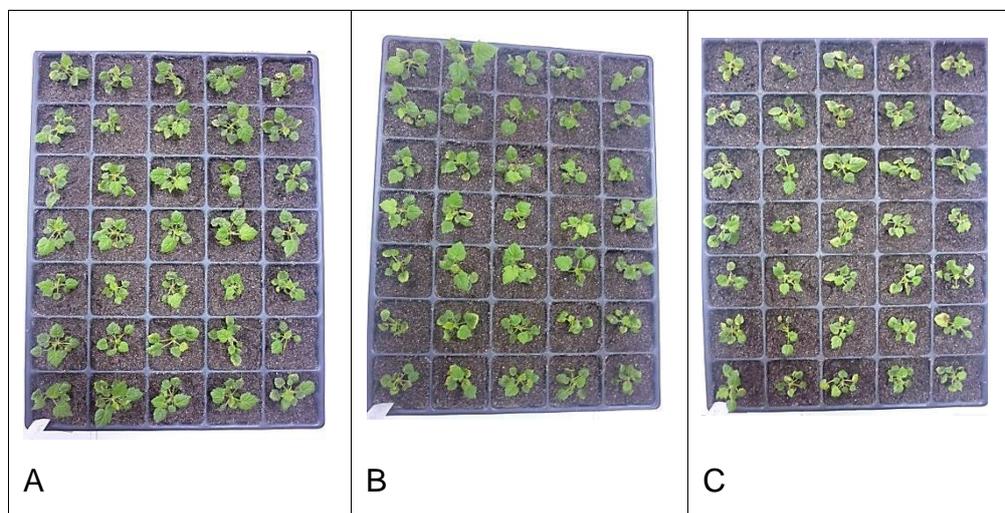


Figura 65. Porcentaje de plántulas aclimatadas en diferente composición de sustrato



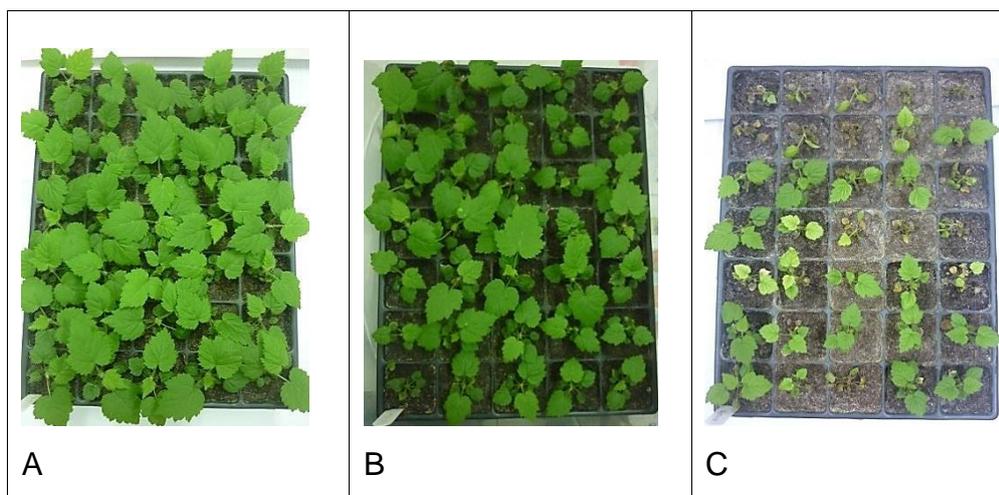
**Figura 66. Media de la altura de plántulas (cm) según tratamientos para la aclimatación de plántulas**



**Figura 67. Plántulas en aclimatación a los 7 días. A. turba:arena 1:1 v/v. B. turba:arena 2:1 v/v. C. turba:arena:humus 1:1:1 v/v**



**Figura 68. Plántulas en aclimatación a los 14 días. A. turba:arena 1:1 v/v. B. turba:arena 2:1 v/v. C. turba:arena:humus 1:1:1 v/v**



**Figura 69. Plántulas aclimatadas a los 21 días. A. turba:arena 1:1 v/v. B. turba:arena 2:1 v/v. C. turba:arena:humus 1:1:1 v/v**

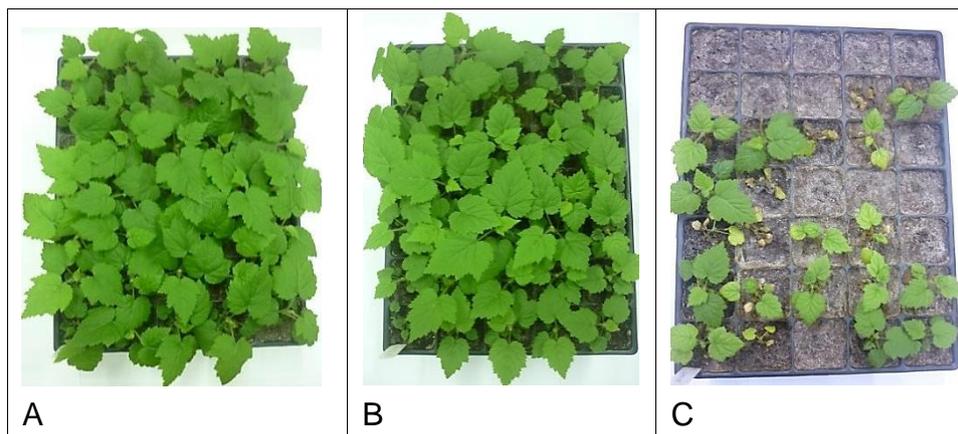


Figura 70. Plántulas en aclimatación a los 30 días. A. turba:arena 1:1 v/v. B. turba:arena 2:1 v/v. C. turba:arena:humus 1:1:1 v/v

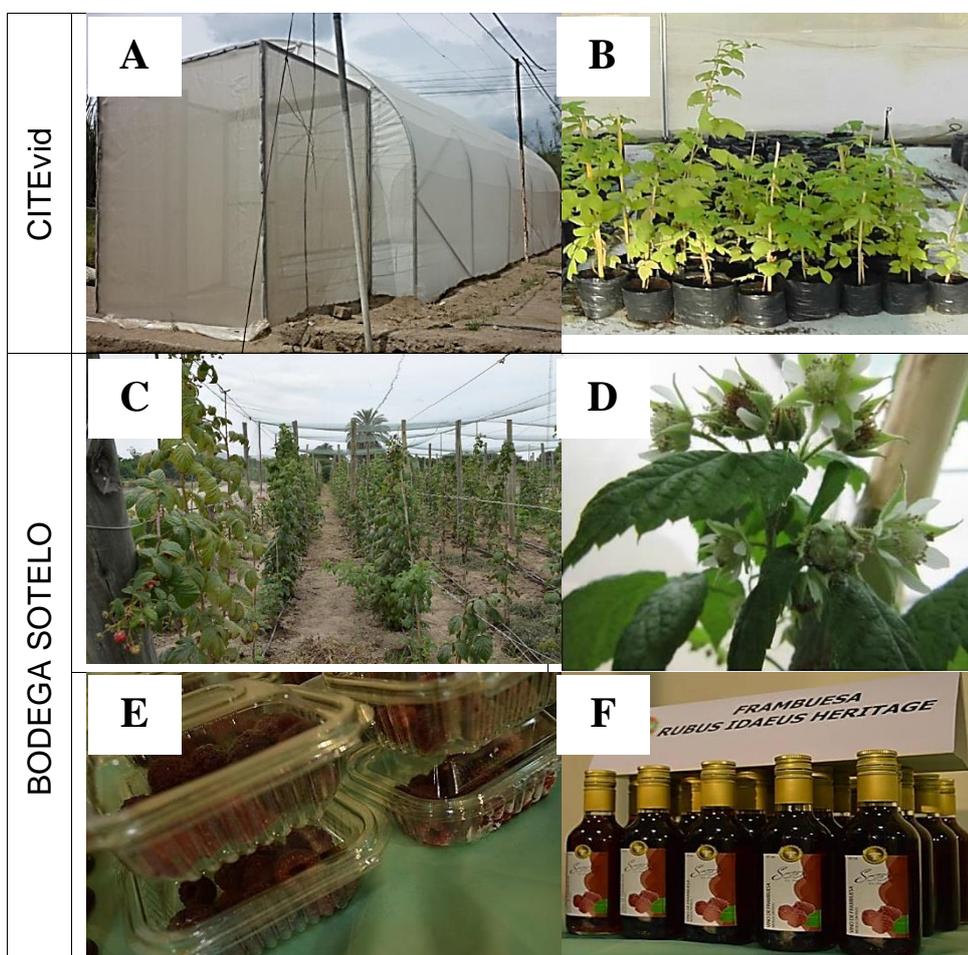


Figura 71. A – D Plantas de frambuesa adaptadas a condiciones de Ica. E – F Frutos y vino de frambuesa

## 9.2. Tablas

**Tabla 1. Determinación del tiempo de exposición de explantes en dos sustancias desinfectantes en la esterilización**

TRATAMIENTO	Hipoclorito de Sodio - NaClO (%)	Tiempo de exposición (min)	Cloruro de Mercurio – HgCl <sub>2</sub> (%)	Tiempo de exposición (min)
T1	-	-	0.1 %	10 min
T2	-	-	0.1 %	5 min
T3	2.5 %	15 min	-	-
T4	2.5 %	10 min	-	-

**Tabla 2. Componentes del medio Murashige and Skoog. 1962 (MS)**

SALES	FÓRMULA	MS
<b>MACROELEMENTOS</b>		
		mg/L
Cloruro de Calcio dihidratado	CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	440
Nitrato de Potasio	KNO <sub>3</sub>	1900
Sulfato de Magnesio heptahidratado	MgSO <sub>4</sub>	370
Fosfato diácido de sodio	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-
Nitrato de amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
Fosfato de potasio monobásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>MICROELEMENTOS</b>		
		mg/L
Cloruro de Cobalto hexahidratado	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.025
Sulfato de Cobre Pentahidratado	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.025
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20
Yoduro de Potasio	KI	0.83
Sulfato de Manganeso monohidratado	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	22.3
Molibdato de sodio dihidratado	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.25
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8.60
Sulfato de hierro heptahidratado		27.8
EDTA		37.3
<b>VITAMINAS</b>		
		mg/L
Adenina Hemisulfato		-
Myo- Inositol		100
Tiamina HCl		0.1
Glicina		2
Acido nicotínico		0.5
Piridoxina		0.5

**Tabla 3. Criterio de evaluación de las variables porcentaje de contaminación, fenolización y sobrevivencia en la esterilización de explantes *in vitro***

Variable	Criterio de evaluación	Codificación
Contaminación	Contaminado	1
	No contaminado	0
Fenolización	Fenolizado	1
	No fenolizado	0
Sobrevivencia	Vivo	1
	muerto	0

**Tabla 4. Determinación de la concentración de sales del medio Murashige and Skoog (MS) como medio de iniciación *in vitro***

TRATAMIENTO	Medio base	Concentración de sales de medio base	pH
T1	MS	Completo	5.7
T2	MS	3/4	5.7
T3	MS	1/2	5.7
T4	MS	1/4	5.7

**Tabla 5. Criterio de evaluación de la variable formación de brotes en la determinación del medio de iniciación (MI) *in vitro***

Variable	Criterio de evaluación	Calificación
Formación de brotes	Presencia de brote	1
	Ausencia de brote	0

**Tabla 6. Determinación de la concentración de citoquinina (6BAP) y giberelina (AG3) para multiplicación clonal *in vitro***

TRATAMIENTO	Medio base	6BAP (mg/L)	GA <sub>3</sub> (mg/L)	pH
T1	MS	-	-	5.7
T2	MS	1	-	5.7
T3	MS	1.5	-	5.7
T4	MS	3	-	5.7
T5	MS	1	0.5	5.7
T6	MS	1.5	1	5.7
T7	MS	2	1	5.7

**Tabla 7. Determinación de la concentración de auxina (AIA) para enraizamiento de plántulas *in vitro***

TRATAMIENTO	Medio base	AIA (mg/L)	Carbón activado (CA) (mg/L)	pH
T1	MS	-	-	5.7
T2	MS	0.5	-	5.7
T3	MS	1	-	5.7
T4	MS	2	-	5.7
T5	MS	1	500	5.7
T6	½ MS	-	-	5.7
T7	½ MS	0.5	-	5.7
T8	½ MS	1	-	5.7
T9	½ MS	2	-	5.7
T10	½ MS	1	500	5.7

**Tabla 8. Estandarización del sistema de aclimatación de plantas de *Rubus idaeus* L.**

TRATAMIENTO	TURBA	ARENA	HUMUS
T1	1	1	-
T2	2	1	-
T3	1	1	1

**Tabla 9. Número de ápices meristemáticos (%) contaminados y no contaminados según tratamientos de esterilización a los 30 días**

Tratamientos	Solución desinfectante	Tiempo de exposición (min)	Número de ápices meristemáticos		
			Contaminados	No contaminados (%)	N
T1	HgCl <sub>2</sub> al 0.1%	10 min	0	10 (100%)	10
T2		5 min	0	10 (100%)	10
T3	NaClO al 2.5%	15 min	0	10 (100%)	10
T4		10 min	0	10 (100%)	10

**Tabla 10. Número de ápices meristemáticos (%) fenolizados y no fenolizados según tratamientos de esterilización a los 30 días**

Tratamientos	Solución desinfectante	Tiempo de exposición (min)	Número de ápices meristemáticos		
			Fenolizados (%)	No fenolizados (%)	N
T1	HgCl <sub>2</sub> al 0.1%	10 min	4 (40%)	6 (60%)	10
T2		5 min	3 (30%)	7 (70%)	10
T3	NaClO al 2.5%	15 min	1 (10%)	9 (90%)	10
T4		10 min	2 (20%)	8 (80%)	10

**Tabla 11. Test de probabilidad exacta de Fisher de la frecuencia de fenolización de ápices meristemáticos según tratamientos 3 y 4 a los 30 días.**

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Estadístico exacto de Fisher				1.000	.500
N de casos válidos	20				

**Tabla 12. Número de ápices meristemáticos (%) vivos y muertos según tratamientos de esterilización a los 30 días**

Tratamientos	Solución desinfectante	Tiempo de exposición (min)	Número de ápices meristemáticos		
			Vivos (%)	Muertos (%)	N
T1	HgCl <sub>2</sub> al 0.1%	10 min	6 (60%)	4 (40%)	10
T2		5 min	7 (70%)	3 (30%)	10
T3	NaClO al 2.5%	15 min	9 (90%)	1 (10%)	10
T4		10 min	8 (80%)	2 (20%)	10

**Tabla 13. Número de miniestacas (%) contaminados y no contaminados según tratamientos de esterilización a los 30 días**

Tratamientos	Solución desinfectante	Tiempo de exposición (min)	Número de miniestacas		
			Contaminados	No contaminados (%)	N
T1	HgCl <sub>2</sub> al 0.1%	10 min	0	10 (100%)	10
T2		5 min	3 (30%)	7 (70%)	10
T3	NaClO al 2.5%	15 min	2 (20%)	8 (80%)	10
T4		10 min	5 (50%)	5 (50%)	10

**Tabla 14. Test de probabilidad exacta de Fisher de la frecuencia de contaminación de miniestacas según tratamientos 1 y 3 a los 30 días.**

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Estadístico exacto de Fisher				.474	.237
N de casos válidos	20				

**Tabla 15. Número de miniestacas (%) fenolizados y no fenolizados según tratamientos de esterilización a los 30 días**

Tratamientos	Solución desinfectante	Tiempo de exposición (min)	Número de miniestacas		N
			Fenolizados (%)	No fenolizados (%)	
T1	HgCl <sub>2</sub> al 0.1%	10 min	3 (30%)	7 (70%)	10
T2		5 min	2 (20%)	8 (80%)	10
T3	NaClO al 2.5%	15 min	1 (10%)	9 (90%)	10
T4		10 min	0 (20%)	10 (100%)	10

**Tabla 16. Número de miniestacas (%) vivos y muertos según tratamientos de esterilización a los 30 días**

Tratamientos	Solución desinfectante	Tiempo de exposición (min)	Número de miniestacas		N
			Vivos (%)	Muertos (%)	
T1	HgCl <sub>2</sub> al 0.1%	10 min	7 (70%)	30 (30%)	10
T2		5 min	5 (50%)	5 (50%)	10
T3	NaClO al 2.5%	15 min	7 (70%)	30 (30%)	10
T4		10 min	5 (50%)	5 (50%)	10

**Tabla 17. Número de miniestacas (%) con presencia y ausencia de brote según tratamientos de concentración de sales del medio de iniciación a los 30 días**

Tratamientos	Concentración de sales	Tiempo de exposición (min)	Número de miniestacas		N
			Presencia de brote (%)	Ausencia de brote (%)	
T1	MS	10 min	8 (80%)	2 (20%)	10
T2	3/4 MS	5 min	6 (60%)	4 (40%)	10
T3	1/2 MS	15 min	6 (60%)	4 (40%)	10
T4	1/4 MS	10 min	5 (50%)	5 (50%)	10

**Tabla 18. Test de probabilidad exacta de Fisher de formación de brote de miniestacas según tratamientos 1 y 2 de concentración de sales del medio de iniciación a los 30 días**

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Estadístico exacto de Fisher				.628	.314
N de casos válidos	20				

**Tabla 19. Media de la altura de brotes de miniestacas según tratamientos de concentración de sales del medio de iniciación a los 30 días**

Tratamiento	Concentración de sales	Media de la altura de brotes (cm)
T1	MS	1.088 ± 0.291
T2	3/4 MS	0.800 ± 0.228
T3	1/2 MS	0.550 ± 0.231
T4	1/4 MS	0.280 ± 0.058

**Tabla 20. ANOVA de un factor de la altura de brotes de miniestacas según tratamientos de concentración de sales del medio de iniciación a los 30 días**

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	209.083	3	69.694	1.808	.178
Intra-grupos	770.875	20	38.544		
Total	979.958	23			

**Tabla 21. Número de brotes según tratamientos en la multiplicación de plántulas en el primer ciclo durante 42 días**

TRATAMIENTOS	Número de brotes				
	7 días	14 días	21 días	30 días	42 días
T1 (Control)	0	1	1	1	1
T2 (1 mg/L 6BAP)	3	7	7	10	10
T3 (1.5 mg/L 6BAP)	7	7	10	10	18
T4 (3 mg/L 6BAP)	1	3	6	8	13
T5 (1 mg/L 6BAP + 0.5 mg/L GA <sub>3</sub> )	0	8	10	11	15
T6 (1.5 mg/L 6BAP + 1 mg/L GA <sub>3</sub> )	0	5	8	11	14
T7 (2 mg/L 6BAP + 1 mg/L GA <sub>3</sub> )	2	4	7	10	12

**Tabla 22. Media del número de brotes por tratamiento en la multiplicación de plántulas en el primer ciclo hasta los 42 días**

TRATAMIENTOS	Media de número de brotes				
	7 días	14 días	21 días	30 días	42 días
T1 (Control)	0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1 (M1)
T2 (1 mg/L 6BAP)	0.3 ± 0.0.15	0.7 ± 0.0.15	0.7 ± 0.0.15	0.9 ± 0.0.23	1.0 ± 0.21
T3 (1.5 mg/L 6BAP)	0.7 ± 0.0.47	0.7 ± 0.0.47	1.0 ± 0.47	1.0 ± 0.47	1.8 ± 0.42 (M2)
T4 (3 mg/L 6BAP)	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.21	0.6 ± 0.22	0.8 ± 0.25	1.3 ± 0.60
T5 (1 mg/L 6BAP + 0.5 mg/L GA <sub>3</sub> )	0.0	0.8 ± 0.25	1.0 ± 0.26	1.1 ± 0.28	1.5 ± 0.31 (M3)
T6 (1.5 mg/L 6BAP + 1 mg/L GA <sub>3</sub> )	0.0	0.5 ± 0.17	0.8 ± 0.20	1.1 ± 0.38	1.4 ± 0.45
T7 (2 mg/L 6BAP + 1 mg/L GA <sub>3</sub> )	0.2 ± 0.13	0.4 ± 0.16	0.7 ± 0.15	1.0 ± 0.37	1.2 ± 0.55
KrusKal Wallis (p- valor)	0.202	0.106	0.108	0.110	0.010
KrusKal Wallis comparación por parejas (p- valor)	-	-	-	-	(M1 vs M2) 0.008 (M1 vs M3) 0.012

**Tabla 23. Media de la altura de brotes por tratamiento en la multiplicación de plántulas en el primer ciclo hasta los 42 días**

TRATAMIENTOS	Media de altura de brotes (cm)				
	7 días	14 días	21 días	30 días	42 días
T1 (Control)	0	0.05	0.05	0.05	0.05
T2 (1 mg/L 6BAP)	0.05	0.079 ± 0.010	0.150 ± 0.044	0.150 ± 0.036	0.260 ± 0.056
T3 (1.5 mg/L 6BAP)	0.093 ± 0.007	0.121 ± 0.021	0.185 ± 0.047	0.270 ± 0.042 (M1)	0.281 ± 0.058
T4 (3 mg/L 6BAP)	0.05	0.05	0.075 ± 0.011	0.081 ± 0.009 (M2)	0.162 ± 0.032
T5 (1 mg/L 6BAP + 0.5 mg/L GA <sub>3</sub> )	0	0.063 ± 0.008	0.100 ± 0.013	0.159 ± 0.028	0.237 ± 0.056
T6 (1.5 mg/L 6BAP + 1 mg/L GA <sub>3</sub> )	0	0.070 ± 0.012	0.075 ± 0.019	0.127 ± 0.034	0.218 ± 0.052
T7 (2 mg/L 6BAP + 1 mg/L GA <sub>3</sub> )	0.05	0.075 ± 0.014	0.086 ± 0.009	0.135 ± 0.018	0.254 ± 0.045
Kruskal Wallis (p- valor)	0.032	0.088	0.264	0.025	0.612
Kruskal Wallis comparación por parejas (p- valor)	-	-	-	(M1 vs M2) 0.030	-

**Tabla 24. Media del número de brotes por tratamiento en la multiplicación de miniestacas en el primer ciclo hasta los 42 días**

TRATAMIENTOS	Número de brotes				
	7 días	14 días	21 días	30 días	42 días
T1 (Control)	21	22	22	23	23
T2 (1 mg/L 6BAP)	20	25	29	35	38
T3 (1.5 mg/L 6BAP)	22	29	33	40	46
T4 (3 mg/L 6BAP)	20	31	34	39	44
T5 (1 mg/L 6BAP + 0.5 mg/L GA <sub>3</sub> )	21	38	46	50	54
T6 (1.5 mg/L 6BAP + 1 mg/L GA <sub>3</sub> )	20	28	33	38	44
T7 (2 mg/L 6BAP + 1 mg/L GA <sub>3</sub> )	22	30	34	40	44

**Tabla 25. Media del número de brotes por tratamiento en la multiplicación de miniestacas en el primer ciclo hasta los 42 días**

TRATAMIENTOS	Media de número de brotes				
	7 días	14 días	21 días	30 días	42 días
T1 (Control)	2.1 ± 0.28	2.2 ± 0.25	2.2 ± 0.25 (M1)	2.3 ± 0.26	2.3 ± 0.26 (M1)
T2 (1 mg/L 6BAP)	2.0 ± 0.30	2.5 ± 0.17	2.9 ± 0.23	3.5 ± 0.34	3.8 ± 0.42
T3 (1.5 mg/L 6BAP)	2.2 ± 0.29	2.9 ± 0.38	3.3 ± 0.30	4.0 ± 0.58	4.6 ± 0.88
T4 (3 mg/L 6BAP)	2.0 ± 0.26	3.1 ± 0.23	3.4 ± 0.27	3.9 ± 0.31	4.4 ± 0.60
T5 (1 mg/L 6BAP + 0.5 mg/L GA <sub>3</sub> )	2.1 ± 0.18	3.8 ± 0.77	4.6 ± 0.99 (M2)	5.0 ± 1.00	5.4 ± 0.98 (M2)
T6 (1.5 mg/L 6BAP + 1 mg/L GA <sub>3</sub> )	2.0 ± 0.30	2.8 ± 0.33	3.3 ± 0.34	3.8 ± 0.44	4.4 ± 0.64
T7 (2 mg/L 6BAP + 1 mg/L GA <sub>3</sub> )	2.2 ± 0.20	3.0 ± 0.26	3.4 ± 0.31	4.0 ± 0.42	4.4 ± 0.65
KrusKal Wallis (p- valor)	0.966	0.236	0.049	0.054	0.032
KrusKal Wallis comparación por parejas (p- valor)	-	-	(M1 vs M2) 0.039	-	(M1 vs M2) 0.021

**Tabla 26. Media de la altura de brotes por tratamiento en la multiplicación de miniestacas en el primer ciclo hasta los 42 días**

TRATAMIENTOS	Media de altura de brotes (cm)				
	7 días	14 días	21 días	30 días	42 días
T1 (Control)	0.074 ± 0.008	0.093 ± 0.014	0.161 ± 0.027	0.207 ± 0.035	0.239 ± 0.043
T2 (1 mg/L 6BAP)	0.065 ± 0.005	0.108 ± 0.015	0.186 ± 0.024	0.214 ± 0.031	0.237 ± 0.034
T3 (1.5 mg/L 6BAP)	0.082 ± 0.010	0.124 ± 0.015	0.196 ± 0.025	0.193 ± 0.025	0.215 ± 0.030
T4 (3 mg/L 6BAP)	0.085 ± 0.008 (M1)	0.124 ± 0.014	0.172 ± 0.022	0.176 ± 0.022	0.203 ± 0.024
T5 (1 mg/L 6BAP + 0.5 mg/L GA <sub>3</sub> )	0.069 ± 0.008	0.117 ± 0.019	0.148 ± 0.026 (M1)	0.173 ± 0.028	0.201 ± 0.032
T6 (1.5 mg/L 6BAP + 1 mg/L GA <sub>3</sub> )	0.090 ± 0.015	0.138 ± 0.023	0.224 ± 0.029 (M2)	0.243 ± 0.030	0.257 ± 0.029
T7 (2 mg/L 6BAP + 1 mg/L GA <sub>3</sub> )	0.052 ± 0.002 (M2)	0.153 ± 0.021	0.212 ± 0.027	0.245 ± 0.031	0.282 ± 0.039
KrusKal Wallis (p- valor)	0.013	0.311	0.033	0.180	0.385
KrusKal Wallis comparación por parejas (p- valor)	(M1 vs M2) 0.006	-	(M1 vs M2) 0.047	-	-

**Tabla 27. Número de raíces por tratamiento en el enraizamiento de plántulas durante 30 días**

TRATAMIENTO	Número de raíces		
	10 días	20 días	30 días
T1 (MS)	2	12	17
T2 (MS + 0.5 mg/L AIA)	0	5	20
T3 (MS + 1 mg/L AIA)	0	1	3
T4 (MS + 2 mg/L AIA)	0	0	0
T5 (MS + 1 mg/L AIA + 500 mg/L CA)	1	5	11
T6 (½ MS)	4	11	12
T7 (½ MS + 0.5 mg/L AIA)	9	14	20
T8 (½ MS + 1 mg/L AIA)	3	22	35
T9 (½ MS + 2 mg/L AIA)	0	19	28
T10 (½ MS + 1 mg/L AIA + 500 mg/L CA)	0	3	13
Kruskal Wallis (p- valor)	0.421	0.054	0.026

**Tabla 28. Media del número de raíces por tratamiento en el enraizamiento de plántulas durante 30 días**

TRATAMIENTOS	Media de altura de brotes (cm)		
	10 días	20 días	30 días
T1 (MS)	0.200 ± 0.1333	1.200 ± 0.593	1.700 ± 0.684
T2 (MS + 0.5 mg/L AIA)	0	0.500 ± 0.307	2.000 ± 0.775
T3 (MS + 1 mg/L AIA)	0	0.100 ± 0.100	0.300 ± 0.213
T4 (MS + 2 mg/L AIA)	0	0	0 (M1)
T5 (MS + 1 mg/L AIA + 500 mg/L CA)	0.100 ± 0.100	0.500 ± 0.307	1.100 ± 0.379
T6 (½ MS)	0.400 ± 0.400	1.100 ± 0.657	1.200 ± 0.727
T7 (½ MS + 0.5 mg/L AIA)	0.900 ± 0.795	1.400 ± 1.087	2.000 ± 1.238
T8 (½ MS + 1 mg/L AIA)	0.300 ± 0.300	2.200 ± 0.917	3.500 ± 1.014 (M2)
T9 (½ MS + 2 mg/L AIA)	0	1.900 ± 0.674	2.800 ± 0.975
T10 (½ MS + 1 mg/L AIA + 500 mg/L CA)	0	0.300 ± 0.153	1.300 ± 0.578
KrusKal Wallis (p- valor)	0.421	0.054	0.026
KrusKal Wallis comparación por parejas (p- valor)	-	-	(M1 vs M2) 0.028

**Tabla 29. Media de longitud de raíces por tratamiento en el enraizamiento de plántulas durante 30 días**

TRATAMIENTO	MEDIA DE LONGITUD DE RAÍCES		
	10 días	20 días	30 días
T1 (MS)	0.600 ± 0.400	1.142 ± 0.351 (M1)	2.347 ± 0.476 (M3)
T2 (MS + 0.5 mg/L AIA)	0	0.320 ± 0.097	0.720 ± 0.097
T3 (MS + 1 mg/L AIA)	0	0.05	0.617 ± 0.289
T4 (MS + 2 mg/L AIA)	0	0	0
T5 (MS + 1 mg/L AIA + 500 mg/L CA)	0.1	1.040 ± 0.293 (M3)	2.073 ± 0.367 (M4)
T6 (½ MS)	0.750 ± 0.253 (M1)	1.982 ± 0.397 (M4)	3.217 ± 0.513 (M5)
T7 (½ MS + 0.5 mg/L AIA)	0.078 ± 0.028 (M2)	0.239 ± 0.058 (M5)	0.635 ± 0.105
T8 (½ MS + 1 mg/L AIA)	0.1(a)	0.246 ± 0.040 (M6)	0.493 ± 0.069 (M1)
T9 (½ MS + 2 mg/L AIA)	0	0.190 ± 0.047 (M2)	0.596 ± 0.106 (M6)
T10 (½ MS + 1 mg/L AIA + 500 mg/L CA)	0	0.667 ± 0.145	1.800 ± 0.309 (M2)
Kruskal Wallis (p- valor)	0.007	0	0
		(M1 vs M2) 0.040	(M1 vs M2) 0.002
		(M2 vs M3) 0.031	(M1 vs M3) 0.000
Kruskal Wallis comparación por parejas (p- valor)	(M1 vs M2) 0.007	(M2 vs M4) 0.000	(M1 vs M4) 0.001
		(M5 vs M4) 0.000	(M1 vs M5) 0.000
		(M6 vs M4) 0.001	(M6 vs M2) 0.012

**Tabla 30. Media de la altura de plántulas por tratamiento en la aclimatación durante 30 días**

TRATAMIENTOS	Media de altura de plántulas (cm)			
	7 días	14 días	21 días	30 días
T1 (Turba : arena V/V 1:1)	1.574 ± 0.031(a) (b)	1.874 ± 0.037	2.269 ± 0.055 (b)	2.889 ± 0.081 (M1)
T2 (Turba : arena V/V 2:1)	1.723 ± 0.069 (b)	1.803 ± 0.070	2.186 ± 0.078 (b)	2.709 ± 0.119 (M2)
T3 (Turba : arena : humus V/V 1:1:1)	1.514 ± 0.033 (a)	1.757 ± 0.034	1.886 ± 0.049 (a)	2.067 ± 0.083 (M3)
Anova / Kruskal Wallis* (p- valor)	0.008	0.247	0.001	0 *
Tukey / Kruskal Wallis comparación por parejas* (p-valor)	(a) 0.651 (b) 0.077	-	(a) 1.000 (b) 0.671	(M1 vs M2)* 0.278 (M1 vs M3)* 0.000 (M2 vs M3)* 0.002

Valores con igual letra dentro de cada columna son homogéneos de acuerdo a la prueba de Tukey a un P<0