

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN.

La zarzamora (*Rubus fruticosus* L.) es una fruta muy apetecida en el mercado nacional e internacional, es rica en vitaminas y minerales que contribuyen al bienestar de las personas, es por ello que al tener un buen manejo fitosanitario con el tiempo será una fruta de exportación que podría enviarse congelada o fresca para su consumo. (Navarrete, 2025)

En Bolivia, la zarzamora (*Rubus fruticosus* L.) se cultiva en las provincias de Cochabamba, Tarija y Chuquisaca. También se encuentran algunas especies en los Yungas de La Paz. Representa un aporte económico significativo y una opción de alta rentabilidad para las familias agricultoras. Su consumo es versátil, tanto en fresco como procesado. La producción boliviana se ve impulsada por el potencial de exportación, especialmente en meses de alta demanda, lo que indica un crecimiento en su cultivo. Se estima que, con un buen manejo agronómico, las plantas pueden tener un periodo productivo de 10 o más años, ofreciendo una fuente constante de ingresos a los pequeños y medianos productores que apuestan por este cultivo. (Pérez, 2018).

La propagación de esta fruta puede ser de dos formas, sexual la cual no es muy recomendada ya que en cada fruto existe baja cantidad de semillas fértiles, además es largo su periodo de germinación y de lento desarrollo de las plántulas. De forma asexual el material debe ser proveniente de plantas sanas y vigorosas, lo que permite que se conserve las mejores características de la planta madre, pero presenta inconvenientes ya que existe rápida diseminación de enfermedades y variabilidad genética. (Casaca, 2016).

La técnica del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* constituye una alternativa con mayor ventaja ya que se puede contar con plantas limpias y propagadas rápidamente, los protocolos para el establecimiento *in vitro* son claves esenciales para obtener plantas de buena calidad, libres de enfermedades. (Hernandez, 2017).

JUSTIFICACION.

Con el pasar del tiempo se ha visto que la propagación tradicional ha sido de poco interés ya que el tiempo en que se demora en salir nuevas plantas es muy lento y existe el riesgo de que presenten enfermedades, plantas irregulares y con escasa viabilidad, es por ello que viendo la necesidad de obtener plantas de zarzamora en un tiempo corto, con características propias de la planta madre y libres de enfermedades, se propone desarrollar técnicas de laboratorio actualizadas como son los protocolos para el establecimiento *in vitro*, de esta manera se asegura que las plantas sean sanas, el tiempo que salen es rápido, y se puede obtener una gran cantidad de plantas, entonces con la presente investigación se pretende determinar cuál de los diferentes protocolos va a tener efecto en el establecimiento *in vitro* de la zarzamora a partir de explantes. (Chanamé, 2020).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En Bolivia, la agricultura todavía se orienta mayormente hacia cultivos tradicionales como la soya, maíz, trigo y caña de azúcar, dejando en segundo plano el desarrollo de especies frutales emergentes como la zarzamora (*Rubus fruticosus* L.) Aunque la especie presenta un comportamiento agronómico favorable en regiones como Tarija, su implementación comercial enfrenta serias limitaciones técnicas y estructurales.

Uno de los principales obstáculos radica en la limitada disponibilidad de material vegetal de calidad, libre de patógenos. Los viveros locales a menudo carecen de protocolos estandarizados para la propagación, lo que resulta en una producción empírica e ineficiente. Esta situación compromete no solo la sanidad de los plantines, sino también su rendimiento en campo, afectando la sostenibilidad del cultivo. (Vargas, 2012).

Por otra parte, el acceso a material vegetal certificado importado resulta económicamente inviable para pequeños productores, quienes recurren a métodos artesanales de propagación con alta incidencia de enfermedades. Esta carencia tecnológica limita el desarrollo competitivo del cultivo y su inserción en circuitos agroindustriales y comerciales. (Chanamé, 2020)

Frente a esta problemática, es necesario desarrollar un protocolo técnico de micropropagación *in vitro* de zarzamora adaptado a las condiciones locales, que permita obtener plantas sanas, homogéneas y de alta calidad, fortaleciendo la cadena productiva y contribuyendo a la diversificación agrícola en Bolivia. (Vargas, 2012).

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Evaluación del establecimiento *in vitro* de explantes de zarzamora (*Rubus fruticosus* L.) Variedad Rosborough. En tres tipos de medios de cultivo en el laboratorio de Fitopatología y Cultivo *in vitro* de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales.

Objetivo Específico.

Evaluar el efecto de tres medios de cultivo de la zarzamora (*Rubus fruticosus* L.).

Evaluar dos métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de la zarzamora (*Rubus fruticosus* L.)

HIPÓTESIS.

Hipótesis De Investigación.

En el establecimiento *in vitro* de la zarzamora (*Rubus fruticosus* L.) al menos uno de los tratamientos provoca un porcentaje de regeneración diferente.

CAPITULO I REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

ANTECEDENTES.

1.1. Origen Y Antecedentes.

La zarzamora (*Rubus fruticosus* L.), al igual que otras especies del género *Rubus*, tiene su origen en regiones templadas del hemisferio norte, donde ha sido cultivada desde tiempos antiguos debido a su notable capacidad de adaptación, rusticidad y productividad bajo diversas condiciones ambientales. Su domesticación y mejora genética han facilitado su expansión hacia América Latina, encontrando en esta región condiciones favorables para su establecimiento, especialmente en zonas de clima templado-húmedo. (Delgado, 2012).

En Bolivia, la producción de zarzamora aún se encuentra en una etapa incipiente, concentrándose principalmente en los departamentos de Tarija, Cochabamba y Chuquisaca. En Tarija, la presencia de valles interandinos con altitudes entre 1.800 y 2.400 metros sobre el nivel del mar, junto a suelos fértiles y una buena disponibilidad hídrica, ofrecen condiciones óptimas para el desarrollo de este cultivo. Sin embargo, la superficie cultivada todavía es reducida y permanece mayormente en manos de pequeños productores que utilizan sistemas tradicionales y carecen de apoyo técnico sistematizado. Iniciativas como Bolivian Berries, Fundación Valles y PROINPA han impulsado la diversificación agrícola promoviendo cultivos frutales no tradicionales, incluida la zarzamora, beneficiando a más de cincuenta familias productoras en áreas rurales. (Casaca, 2016).

No obstante, la mayoría de los cultivos actuales dependen de métodos convencionales de propagación, tales como el uso de hijuelos, estacas o esquejes leñosos. Aunque accesibles y de bajo costo, estas técnicas presentan serias limitaciones agronómicas, principalmente por la baja tasa de multiplicación, la transmisión de enfermedades bacterianas, fúngicas y virales, y la heterogeneidad genética del material propagado. Esta variabilidad genética genera plantas con características agronómicas dispares, afectando la uniformidad del cultivo, la calidad del fruto, la resistencia a enfermedades

y la longevidad del sistema productivo. Tales factores restringen la expansión sostenible y comercial de la zarzamora en Bolivia. (Casaca, 2016).

Frente a esta problemática, la micropropagación *in vitro* emerge como una alternativa tecnológica eficiente para la producción masiva de plantas sanas, homogéneas y libres de patógenos. Este método permite establecer bancos de germoplasma, optimizar protocolos de enraizamiento y aclimatación, y garantizar un suministro estable de material vegetal certificado. En Tarija, el desarrollo de protocolos específicos para la propagación *in vitro* de (*Rubus fruticosus* L.) variedad Rosborough, representa un paso decisivo para mejorar la oferta técnica, fortalecer la cadena de valor del cultivo y consolidar su inclusión en los planes de desarrollo agrícola departamental. (INIAF, 2013).

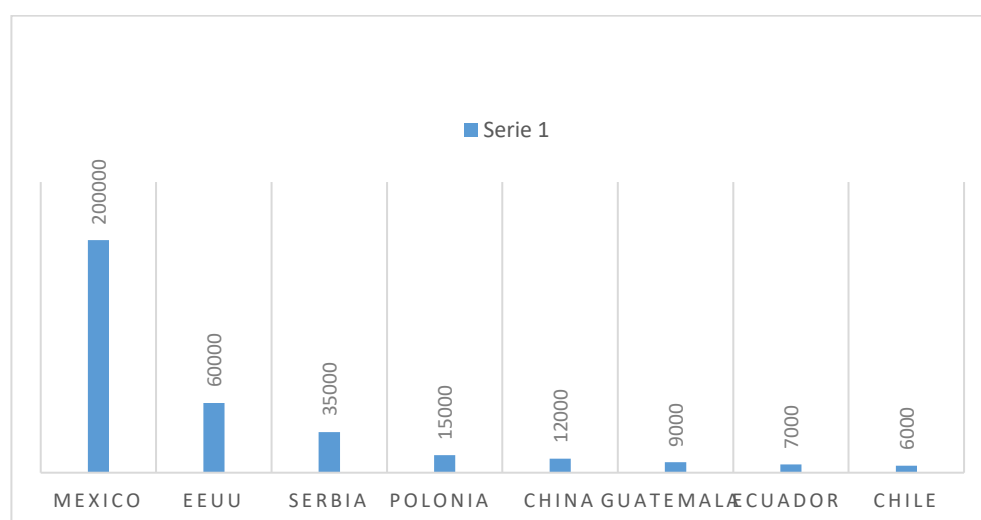
1.2. Producción Mundial

En la última década, la producción mundial de zarzamora ha mostrado un crecimiento sostenido, impulsado por cambios en los hábitos alimenticios hacia productos más saludables y funcionales, así como por una mayor familiarización del consumidor con esta fruta. Reconocida como una “superfruta” por su alto contenido de antocianinas, vitamina C, fibra y compuestos antioxidantes, la zarzamora ha ganado presencia en mercados internacionales debido a su versatilidad culinaria y beneficios para la salud, además de su amplia aplicación en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética (Kaur, 2025).

América se destaca como líder en producción y comercialización, con México como principal productor y exportador a nivel global. Según datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera de México y el informe de Rabobank (2023), la producción mexicana aumentó a una tasa promedio anual del 6% entre 2012 y 2022, alcanzando aproximadamente 210.000 toneladas métricas en 2022. Esta producción, concentrada principalmente en el estado de Michoacán y bajo sistemas tecnificados que incluyen riego por goteo, mallas anti insectos y cultivos protegidos, destina el 95% de su volumen a la exportación, principalmente hacia Estados Unidos y Canadá. (Kaur, 2025).

Otros países relevantes en la producción mundial incluyen Estados Unidos (con cultivos en Oregón y California), Serbia, Polonia, Chile, Guatemala, Ecuador y Bosnia-Herzegovina. En Europa, Serbia se destaca como líder regional y exportador, con un enfoque particular en mora congelada para alimentación procesada. En Sudamérica, Chile y Ecuador fortalecen su producción con fines de exportación, mientras que países andinos como Colombia, Perú y Bolivia mantienen sistemas productivos más tradicionales, aunque con proyecciones de crecimiento a mediano plazo. (Kaur, 2025).

Gráfica 1: Producción Mundial De La Zarzamora.



Fuente: (Kaur, 2025).

1.2.1. Situación Nacional De La Zarzamora En Bolivia.

En Bolivia, el cultivo de zarzamora (*Rubus fruticosus* L.) ha comenzado a adquirir importancia en zonas de clima templado, especialmente en los departamentos de Tarija, Cochabamba, La Paz y algunas áreas altas de Santa Cruz. Aunque su producción sigue siendo limitada y mayormente artesanal, se observa un creciente interés por este fruto debido a su demanda en fresco y en productos procesados como mermeladas, jugos y postres. Según datos del Censo Agropecuario 2013, durante las campañas de invierno 2012 y verano 2012–2013, se registró una superficie cultivada de 1.8 hectáreas, con una producción total de 4 toneladas métricas a nivel nacional, lo que evidencia el estado incipiente del cultivo en el país. (Pérez, 2018).

No obstante, la falta de estandarización varietal, así como de tecnologías eficientes de propagación, ha limitado su expansión comercial. En este contexto, se han iniciado esfuerzos para introducir y evaluar nuevas variedades con mayor potencial productivo, como la ‘Rosborough’, reconocida por su fruta de buena calidad, alto rendimiento y aptitud para técnicas de cultivo *in vitro*, lo que la convierte en una opción prometedora para su desarrollo en los valles mesotérmicos de Tarija. (INIAF, 2013).

1.2.2. Producción Local De Zarzamora En Tarija.

El proyecto "Desarrollo Hortofrutícola de Cultivos Competitivos para el Valle Central de Tarija", implementado por la Asociación de Fruticultores de Tarija (AFRUTAR) con el apoyo de la Fundación Valles y el Proyecto MAPA, introdujo diversas variedades de zarzamora provenientes de Estados Unidos en el año 1990. Estas variedades incluyeron tanto opciones sin espina como con espina. Se establecieron parcelas de investigación en diferentes comunidades para evaluar su adaptación a las condiciones ambientales locales, observándose que la variedad Rosborough mostró una adaptación más rápida en la zona de Rancho Norte en comparación con otras variedades sin espina como Apache, Triple Crown, Arapaho y Chester. (AFRUTAR, 2013).

En el departamento de Tarija, la producción de zarzamora ha ganado impulso, especialmente en comunidades como Canasmoro y Rancho Norte en la provincia Méndez. Pequeños productores han logrado cultivos exitosos gracias a las condiciones climáticas favorables. Se han multiplicado 1,550 plantas de zarzamora, incluyendo variedades sin espina como Apache, Triple Crown, Chester, Navajo y Arapaho, y una variedad con espina, la Rosborough. Un ejemplo de éxito es el agricultor Fernando Perales, secretario general de AFRUTAR, quien cultiva zarzamora en cuatro parcelas y reporta rendimientos de hasta 2 toneladas anuales. Su cosecha, que se extiende de noviembre a marzo, abarca diversas etapas de maduración del fruto. Además de vender fruta fresca localmente, Perales elabora y comercializa helados artesanales de zarzamora, que han tenido buena aceptación. El cultivo se integra en policultivos con otros frutales y se beneficia de prácticas como el riego por goteo. (AFRUTAR, 2013).

1.3.Taxonomía:

Tabla 1: Taxonomía.

Categoría taxonómica	Clasificación
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Género	<i>Rubus</i>
Especie	<i>Rubus fruticosus</i> L. (mora común / zarzamora)

1.4.Morfología.

Anexo 1: Morfología. (*Linneo, 1753*).

- 1.4.1. Tallos (Cañas):** Sarmentosos, de crecimiento erecto, semi-erecto o rastrero, generalmente cubiertos de aguijones (espinas) en forma de gancho. Son bianuales: crecen el primer año (primocañas) y fructifican el segundo (floricañas).
- 1.4.2. Raíz:** Sistema radicular perenne, leñoso, extendido y superficial, capaz de emitir nuevos brotes (estolones).
- 1.4.3. Hojas:** Alternas, imparipinnadas, con peciolo largo y generalmente 3 o 5 folíolos de borde aserrado.
- 1.4.4. Flores:** Hermafroditas, con 5 pétalos blancos o rosados, agrupadas en racimos laterales o terminales.
- 1.4.5. Fruto:** Polidrupa (agregado de pequeñas drupas o "drupitas" adheridas a un receptáculo). Cambia de color verde a rojo, y finalmente negro brillante al madurar.
- 1.4.6. Variabilidad:** Existen variedades erectas, rastreras, con espinas o inermes (sin espinas).

1.5.Condiciones Ambientales.

1.5.1. Clima.

La zarzamora se adapta a altitudes que van desde los 1.200 hasta los 3.500 m.s.n.m., aunque presenta mejor desarrollo y rendimiento entre los 1.800 y 2.400 m.s.n.m. A mayores altitudes (por encima de 2.400 m.s.n.m.) la calidad del fruto y el rendimiento disminuyen debido a las bajas temperaturas. Entre los 2.000 y 2.300 m.s.n.m. se observan condiciones óptimas de productividad y menores problemas fitosanitarios. (Türemis, 2003)

1.5.2. Humedad Relativa.

La humedad relativa ideal para el cultivo de zarzamora debe oscilar entre 70% y 80%. Humedades superiores sostenidas por más de tres días pueden favorecer la aparición de enfermedades fúngicas . (FAO, 2017).

1.5.3. Temperatura.

Las temperaturas óptimas para el desarrollo del cultivo están entre 14 y 18 °C, aunque también se adapta a rangos que van de 10 a 18 °C o 11 a 18 °C. Temperaturas superiores o inferiores a este rango afectan negativamente el crecimiento y la floración. (Meyers, 2014)

1.5.4. Precipitación.

El cultivo requiere precipitaciones anuales entre 1.200 y 2.500 mm. Las épocas de menor lluvia suelen coincidir con los momentos de producción más intensiva, lo que beneficia la calidad del fruto al reducir la incidencia de enfermedades. (FAO, 2017).

1.5.5. Brillo Solar.

La zarzamora requiere entre 1.200 y 1.600 horas de luz solar al año para completar sus procesos fisiológicos de fotosíntesis y transformación. A mayor radiación solar, aumentan también los requerimientos hídricos y nutricionales (Meyers, 2014)

1.5.6. Suelos.

Son ideales los suelos de textura franca, con buena capacidad de retención de humedad, pero lo suficientemente permeables como para evitar encharcamientos. Estos deben ser ricos en materia orgánica, ya que la mora requiere un entorno fértil para su desarrollo. Aunque tolera suelos ácidos, se comporta mejor en suelos con pH cercano a la neutralidad. (FAO, 2017).

Es exigente en nutrientes como nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio, y necesita suelos con profundidades mínimas de 50 centímetros para permitir el adecuado desarrollo radicular. En zonas con alta pluviosidad, se prefieren terrenos inclinados que favorezcan el drenaje natural. La humedad del suelo es fundamental, ya que la planta de mora mantiene un crecimiento constante, tanto vegetativo como productivo, y cualquier deficiencia hídrica afecta negativamente su rendimiento. (Meyers, 2014).

1.6. Preparación Del Terreno.

Con el fin de remover lo menos posible el suelo, especialmente en terrenos con pendiente, se recomienda preparar individualmente cada sitio de siembra mediante hoyos de 40 x 40 x 40 centímetros. La tierra extraída debe mezclarse con uno o dos kilogramos de materia orgánica antes de ser devuelta al hoyo. Esta labor debe realizarse con aproximadamente un mes de anticipación a la siembra para permitir la adecuada incorporación de nutrientes al suelo. En zonas inclinadas, el trazado debe seguir las curvas de nivel, mientras que en terrenos planos es preferible orientarlo de oriente a occidente para favorecer una mejor captación de radiación solar. (Bernal, 1996).

1.7.Densidades De Población.

La densidad de población en el cultivo de zarzamora varía según la fertilidad del suelo, el plan de fertilización y el manejo agronómico que se aplique. Las plantas responden directamente a la disponibilidad de agua y nutrientes, y cuando no están bien nutridas, presentan debilidad y bajo rendimiento. En suelos de alta fertilidad, se recomienda aumentar las distancias de siembra para evitar la competencia excesiva. Las densidades pueden oscilar entre 1.100 y 5.000 plantas por hectárea, utilizando distancias de dos a tres metros entre surcos y uno a tres metros entre plantas, dependiendo del sistema de

conducción y la variedad utilizada. Una estrategia efectiva de manejo es dividir el cultivo en lotes de hasta 500 plantas, separados por callejones amplios, lo que facilita las labores de campo y mejora la eficiencia del trabajo (Bernal, 1996).

1.8.Biotecnología.

La biotecnología es el conjunto de técnicas que utilizan organismos vivos, células o componentes celulares para desarrollar productos o procesos útiles en diversos sectores como la agricultura, la medicina, la industria y el medio ambiente. En el ámbito agrícola, la biotecnología permite mejorar genéticamente cultivos, optimizar su rendimiento, aumentar su resistencia a plagas y enfermedades, y conservar recursos genéticos esenciales para la seguridad alimentaria. (Bernal, 1996).

1.8.1. Biotecnología Vegetal.

La biotecnología vegetal aplicada al cultivo de zarzamora incluye el uso de técnicas como el cultivo *in vitro*, la micropropagación clonal y la selección asistida por marcadores moleculares, las cuales han demostrado ser herramientas eficientes para el mejoramiento genético y la multiplicación de plantas de alta calidad. Estas tecnologías permiten acelerar el proceso de propagación, al obtener un número elevado de plantas en un tiempo reducido, a partir de explantes seleccionados, bajo condiciones estériles y controladas que minimizan la presencia de patógenos. (Türemis, 2003).

Asimismo, estas herramientas biotecnológicas contribuyen a la conservación y multiplicación de germoplasma valioso, incluyendo variedades silvestres o locales con potencial productivo y genético, que de otra manera podrían perderse. También posibilitan la generación de nuevas variedades híbridas con alto rendimiento y mejor adaptación a los sistemas de producción intensiva o ecológica. En conjunto, estas estrategias incrementan la eficiencia reproductiva del cultivo, reducen los riesgos sanitarios y aseguran la disponibilidad de material vegetal sano y de calidad para los agricultores. (Brown, 2000).

1.9. Adaptación Climática De La Frambuesa Y Zarzamora.

En respuesta a los efectos del cambio climático, se han desarrollado cultivos experimentales de frambuesa, zarzamora y otras especies frutales en zonas altas de los valles españoles, con el fin de evaluar su adaptación a condiciones climáticas exigentes. En estas pruebas, se establecieron 2.500 plantas, incluyendo tanto especies autóctonas (frambuesa, mora, arándano y guillomo), como especies no autóctonas (haskap y aronia). (Westwood, 1982).

Los resultados mostraron que la producción de frambuesa y zarzamora en altura es viable y presenta ventajas frente a regiones más meridionales, donde las altas temperaturas, la escasez de lluvias y la mayor incidencia de plagas reducen la eficiencia del cultivo. En cambio, en condiciones de altura, las plantas mostraron un buen desarrollo sin la necesidad de aplicar tratamientos fitosanitarios, ya que no se registraron enfermedades ni ataques de plagas que comprometieran su crecimiento (Westwood, 1982).

La recolección de las especies fue escalonada a lo largo de varios meses, lo que permite establecer un calendario agrícola ordenado, sin que coincidan periodos intensivos de cosecha entre las diferentes especies. Asimismo, la resistencia a las heladas fue confirmada, lo que demuestra la capacidad de estas plantas para adaptarse a climas fríos y cambiantes, representando una alternativa sostenible frente al impacto del cambio climático. (Garcia, 2001).

1.10. Reproducción Sexual Y Asexual De La Zarzamora

La zarzamora (*Rubus fruticosus* L.) se reproduce tanto sexual como asexualmente, lo que contribuye a su adaptabilidad y capacidad de dispersión.

La reproducción sexual ocurre a través de la polinización de sus flores, seguida del desarrollo de frutos que contienen semillas. Estas semillas, al germinar, dan lugar a nuevas plantas genéticamente distintas de la planta madre. Este proceso es fundamental para la diversidad genética dentro de la especie y para la adaptación a diferentes condiciones ambientales. (George, 2020).

En cuanto a la reproducción asexual, la zarzamora posee una notable capacidad para propagarse vegetativamente. Sus tallos, conocidos como cañas, tienen la habilidad de enraizar fácilmente cuando entran en contacto con el suelo, especialmente en climas moderados. Este fenómeno, conocido como enraizamiento de puntas o acodo, permite que las ramas se extiendan y formen nuevas plantas independientes a partir de un mismo sistema radicular. Además, las raíces de la planta pueden generar nuevos brotes, conocidos como hijuelos, que emergen del suelo y se desarrollan en plantas separadas. Estas cañas del primer año, llamadas primocañas, crecen verticalmente y pueden alcanzar alturas considerables. A través de prácticas de poda adecuadas, se puede estimular la producción de estas cañas y, por ende, la capacidad de la planta para reproducirse asexualmente y colonizar nuevas áreas. Este tipo de reproducción asegura la perpetuación de características deseables de la planta madre y permite una rápida colonización de hábitats favorables. (tecnoagro, 2024).

1.11. Tipos De Poda En Zarzamora.

En el cultivo de zarzamora se practican tres tipos principales de poda:

1.11.1 Poda De Formación: Se realiza en los primeros años del cultivo para dar forma a la planta y facilitar su manejo.

Se seleccionan de 4 a 6 brotes fuertes y se eliminan los débiles. Se guía la planta en espalderas para facilitar la distribución de luz y aire. (German, 2018).

1.11.2 Poda De Fructificación O Producción:

Se realiza cada año al final de la cosecha. Se eliminan los tallos que ya produjeron (bienales), ya que no volverán a fructificar. Se seleccionan los rebrotes sanos para la siguiente campaña. (Gutiérrez et al., 2018).

1.11.3. Poda De Renovación O Rejuvenecimiento:

Se realiza en plantas adultas (más de 4 años) para estimular brotes nuevos y vigorosos. Se eliminan ramas viejas, secas o enfermas desde la base. (German, 2018).

1.12. Plagas Comunes En Zarzamora (Tarija, Bolivia).

Entre las plagas más comunes se encuentran los trips (*Frankliniella Occidentalis*), que atacan las flores y frutos tiernos, causando deformaciones y manchas antiestéticas. Para su control, se recomienda el uso de trampas adhesivas de color azul, así como métodos naturales como extractos de ajo o neem. Durante la etapa de floración, la aplicación de spinosad ha demostrado ser efectiva. (Frutícola, 2015).

Otra plaga de consideración es la mosca de la fruta (*Anastrepha spp.*), la cual introduce el patógeno que acelera la pudrición de los frutos. La recolección y eliminación de los frutos caídos al suelo es una medida preventiva crucial. Asimismo, el uso de trampas con proteína hidrolizada y la aplicación de insecticidas a base de spinosad en forma de cebo son estrategias de control recomendadas. (Frutícola, 2015).

Finalmente, la arañuela roja (*Tetranychus urticae*) suele presentarse en épocas secas, manifestándose con un amarillamiento y posterior caída de las hojas. Para combatirla, se pueden emplear acaricidas específicos como la abamectina o el azufre mojable. Alternativamente, preparados caseros a base de jabón potásico también ofrecen una solución para su manejo. (Solagro, 2014).

1.13. Enfermedades Frecuentes En Zarzamora:

El moho gris (*Botrytis cinerea*) es una enfermedad que afecta a flores y frutos de la zarzamora, especialmente en condiciones de alta humedad ambiental. Para su control, se recomienda realizar podas que mejoren la ventilación de la planta y aplicar fungicidas preventivos como captan o boscalida. (Solugral, 2026).

La roya de la zarzamora (*Kuehneola uredinis*) se manifiesta con la aparición de manchas de color anaranjado en el envés de las hojas. Las medidas de manejo incluyen la eliminación de las hojas afectadas, la rotación de cultivos y la aplicación de fungicidas como mancozeb o azoxistrobina. Por último, la antracnosis (*Elsinoë veneta*) causa lesiones hundidas en los tallos jóvenes, lo que puede disminuir el vigor general de la planta. Se aconseja realizar podas sanitarias y aplicar tratamientos a base de cobre durante la etapa de brotación y después de las lluvias. (Smith, 2016).

1.14. Tratamientos Fitosanitarios:

El manejo integrado de plagas (MIP) en el cultivo de zarzamora es fundamental para un control efectivo y sostenible, y los tratamientos fitosanitarios son solo una parte de esta estrategia integral. El MIP busca combinar diversas tácticas para mantener las poblaciones de plagas por debajo de umbrales de daño económico, minimizando el impacto ambiental y los riesgos para la salud humana. (Cintis, 2018).

Dentro de este enfoque, el control cultural juega un papel preventivo crucial. Prácticas como la poda adecuada no solo mejoran la sanidad de la planta al permitir una mejor circulación de aire y penetración de luz, sino que también eliminan partes afectadas por enfermedades o plagas. La desinfección de herramientas de poda es esencial para evitar la diseminación de patógenos entre plantas. Asimismo, la eliminación de residuos de cosecha y de plantas enfermas reduce las fuentes de inóculo para futuras infestaciones. (FAOTAPO, 2018).

El control biológico se enfoca en el uso de organismos vivos que atacan a las plagas. En el caso de la zarzamora, se puede recurrir a enemigos naturales para controlar plagas como los trips y la mosca de la fruta. Por ejemplo, la introducción o fomento de parasitoides específicos puede ayudar a regular las poblaciones de trips, mientras que ciertos insectos benéficos pueden depredar huevos o larvas de la mosca de la fruta. Esta estrategia es altamente específica y tiene un bajo impacto ambiental. (Patricio, 2018).

Finalmente, el control químico, aunque necesario en ciertas ocasiones, debe ser aplicado de manera racional y como último recurso dentro del MIP. Esto implica una selección cuidadosa de los ingredientes activos, priorizando aquellos con menor toxicidad y mayor selectividad. La rotación de ingredientes activos es vital para prevenir el desarrollo de resistencias en las poblaciones de plagas, asegurando la efectividad de los productos a largo plazo. Es importante seguir las recomendaciones de aplicación, dosis y momentos oportunos para maximizar la eficacia y minimizar los riesgos asociados al uso de productos fitosanitarios. (INIA, 2020).

1.15. Cultivo *in vitro*:

1.15.1. Generalidades:

El cultivo *in vitro* se define como el conjunto de técnicas diseñadas y viables para el desarrollo, crecimiento y multiplicación de células, tejidos u órganos vegetales que puedan ser considerados como propágulo o explante capaz de regenerar un individuo completo, utilizando un medio de cultivo el cual es una formulación de sustancias nutritivas, puede ser líquido o sólido (dependerá del material biológico seleccionado o de las necesidades del tejido y del objetivo final), en un entorno estéril y en condiciones controladas; el cultivo *in vitro* es parte esencial e integral de la Biotecnología Vegetal. (Garzon, 2018).

Esta herramienta permite propagar a gran escala especies vegetales, obtener plantas de calidad, libres de patógenos y genéticamente estables, restauración de plantas en peligro de extinción, pudiendo utilizar las plantas propagadas posteriormente en ingeniería genética y Fitoremediación, entre otros; minimizando el espacio y tiempo necesario de cultivo al compararla con otras técnicas tradicionales de cultivo (Segui, 2023).

Esta herramienta permite propagar a gran escala especies vegetales, obtener plantas de calidad, libres de patógenos y genéticamente estables, restauración de plantas en peligro de extinción, pudiendo utilizar las plantas propagadas posteriormente en ingeniería genética y Fitoremediación, entre otros; minimizando el espacio y tiempo necesario de cultivo al compararla con otras técnicas tradicionales de cultivo. (Garzon, 2018).

1.16. Medio De Cultivo.

Un medio de cultivo se define como la formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos que son requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos, en el cultivo *in vitro*, el material vegetal se lo puede introducir en medios tanto líquidos como sólidos, todo dependerá básicamente del material biológico seleccionado o de las necesidades del tejido y del objetivo final. (Gamborg, 1976).

Para poder obtener una planta completa *in vitro* con éxito, depende básicamente de la naturaleza del explante, la composición y tipo del medio nutritivo, y las condiciones del cultivo. (Gamborg, 1976).

1.16.1. El Agua.

Se conoce muy bien la importancia del agua para el desarrollo de los seres vivos y representa el 95% del medio nutritivo, no obstante, para la preparación de medios de cultivo se debe evitar la utilización de agua corriente; dentro de un laboratorio de cultivo de tejidos, deben existir destiladores para obtener agua destilada de buena calidad, dicha agua va destinada no solo para la elaboración de los medios nutritivos, sino también para el lavado de todo el material a utilizar y además para enjuagar las partes vegetales que se requiere previamente en la siembra. (Suarez, 2020).

1.16.2. Sales Minerales.

Todos los minerales que son necesarios para el crecimiento de las plantas, también son esenciales para el crecimiento de tejidos y órganos cultivados *in vitro*, por ello las sales minerales presentes en el medio de cultivo pueden dividirse en macro y micro elementos. (Pérez, 2018).

1.16.3. Macronutrientes.

Son los elementos que los organismos vegetales requieren en cantidades grandes, dentro de este grupo se puede mencionar al Nitrógeno (N), Potasio (K), Fósforo (P), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Azufre (S), su concentración dependerá del medio de cultivo a utilizar, y los requerimientos de la especie vegetal. (Brown, 2000).

1.16.4. Micronutrientes:

El Manganeseo (Mn), Hierro (Fe), Zinc (Zn), Cobre (Cu), Molibdeno (Mo), Boro (B), Níquel (Ni) y el Cloro (Cl) son los nutrientes minerales que las plantas requieren en cantidades muy pequeñas, habitualmente en trazas ya que una cantidad mayor a la requerida puede presentar toxicidad o causar daños en el cultivo. (Brown, 2000)

1.16.5. Fuente De Carbono.

Dado que los cultivos *in vitro* son heterótrofos ya que la fotosíntesis no se realiza en las condiciones necesarias para garantizar un suministro adecuado de energía, necesitan un aporte externo de carbohidratos. (Zuñiga, 2023).

La sacarosa es el azúcar más utilizado en los medios nutritivos, se utiliza en concentraciones del 2 al 3%; al autoclavarla, algunas porciones se pueden transformar en glucosa y en fructosa, los medios de cultivo con sacarosa presentan tres carbohidratos al salir de su esterilización. (Zuñiga, 2023).

1.17. Reguladores De Crecimiento.

Las hormonas vegetales funcionan como mensajeros químicos que controlan el metabolismo durante el crecimiento y desarrollo de la planta, para obtener mejores resultados en el cultivo *in vitro* es importante usar diferentes tipos de hormonas vegetales y no limitarse a usar una en concreto, la interacción entre éstas se verá reflejada en el desarrollo del cultivo. (Fichet, 2017). Como hormonas de crecimientos tenemos las siguientes: (Murillo, 2014).

1.17.1. Auxinas.

Se derivan del triptófano o de la biosíntesis del triptófano y su síntesis se produce en los ápices, raíces y tienen la capacidad de ser transportadas de célula a célula o por el floema. (Fichet, 2017).

La auxina que se encuentra distribuida en el reino vegetal en mayor proporción es la AIA (Ácido indolacético), seguida de la AIB (Ácido indolbutírico), del Ácido fenil acético y del Ácido 4 cloro indolacético, existen auxinas sintéticas con actividades similares a las auxinas naturales, entre estas se encuentra el ANA (ácido naftalenacético), y el 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético). (Murillo, 2014).

1.17.2. Citoquininas.

Las citoquininas estimulan la división celular cuando interactúan con las auxinas, son las responsables de los diferentes efectos en el desarrollo vegetal (Merino, 2001). Las citoquininas naturales se obtienen de los derivados de la base púrica adenina, se

presentan en forma libre en los tejidos vegetales o aglomerada en compuestos nucleosidos, nucleótidos, entre otros; entre los compuestos con actividad citoquinina encontramos a benciladenina (BAP), quinetina (KIN), diazuron (TDZ), isopenteniladenina, ceratina (Sharry, 2015).

Los compuestos con actividad citoquinina favorecen a la generación y crecimiento de callos, la maduración de embriones somáticos en muchas especies, la iniciación de yemas axilares, aunque se encuentren solas en el medio nutritivo e inhiben la formación de raíces. (Sharry, 2015).

1.17.3. Giberelinas.

Su presencia en el medio de cultivo no es esencial, pero la aplicación exógena estimula el crecimiento de tallos y meristemos en yemas, elongación de entrenudos, la germinación de semillas, controlan la inducción floral, el crecimiento y desarrollo del fruto e inhiben el reposo de yemas y embriones aislados. (Brito, 2010).

1.17.4. Vitaminas Y Aminoácidos.

La mayoría de las vitaminas son requeridas en cantidades mínimas por una gran cantidad de plantas cuando se encuentran en condiciones de cultivo *in vitro*. (Pérez, 2018). El Ácido nicotínico, piridoxina y Tiamina son las vitaminas más utilizadas, siendo la Tiamina determinante para el crecimiento de los tejidos. (Levitus, 2010).

El Ácido nicotínico es una vitamina foto y termoestable, actúa como coenzima de las enzimas deshidrogenasas que catalizan las reacciones de óxido-reducción. (Levitus, 2010).

La piridoxina es igual una vitamina foto y termoestable, su actividad más importante es la síntesis de purinas y pirimidinas, por ende participa en el metabolismo de los ácidos nucleicos (Brito, 2010).

La tiamina es una vitamina foto estable, esencial para el crecimiento, pero en la esterilización en autoclave se descompone en pirimidina y tiazol, donde la mayoría de los tejidos sintetizan la tiamina mediante los productos de su descomposición (Puche,

2012).

Ph Del Medio Nutritivo.

La regulación del pH dentro del medio nutritivo, es un paso fundamental, ya que, si éste es muy bajo o muy alto, el agar y otros compuestos se hidrolizan, lo que generaría un incremento de carbohidratos que impiden el crecimiento del tejido, cuando el medio tiene un pH superior a 8 e inferior a 4 este no solidifica, mientras que a un pH demasiado bajo las auxinas, giberelinas y ciertas vitaminas, son inestables y además se pueden precipitar algunas sales minerales. (Sharry, 2015).

El rango adecuado del pH va de entre 5,6 a 6 antes de su esterilización en autoclave, para poder realizar el ajuste del pH se utilizan soluciones básicas como hidróxido de sodio e hidróxido de potasio y soluciones ácidas como el ácido clorhídrico. (Puche, 2012).

1.18. Medio Murashige Y Skoog.

El medio de cultivo Murashige y skoog (MS), fue desarrollado específicamente para la formación de tallos de tabaco, pero su composición resulto ser útil para muchas otras especies hasta terminar siendo el medio de cultivo más utilizado y a partir de este se han desarrollado diferentes variaciones (Pérez, 2006).

El medio de cultivo Murashige y skoog (MS), fue desarrollado específicamente para la formación de tallos de tabaco, pero su composición resulto ser útil para muchas otras especies hasta terminar siendo el medio de cultivo más utilizado y a partir de este se han desarrollado diferentes variaciones. (Ancasi, 2016).

El medio MS presenta como características principales, el alto contenido de potasio y nitrógeno, del cual un tercio del total es aportado en forma de ion amonio reducido. Ocasionalmente el contenido de iones del medio MS supera el óptimo para el desarrollo de la especie cultivada y en estos casos se puede emplear un medio con sales a concentraciones inferiores a las normales; estas modificaciones en los macro y micronutrientes pueden llegar a la mitad o hasta incluso una menor concentración. (Ancasi, 2016).

Nombre	Formula	Mg/L
1. Macronutrientes		
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	1650
Nitrato de potasio	KNO ₃	1900
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
Fosfato monopotásico	KH ₂ PO ₄	170
2. Micronutrientes		
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6.2
Sulfato de manganeso tetrahidratado	MnSO ₄ . 4H ₂ O	22.3
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.6
Yoduro de potasio	KI	0.83
Molibdato de sodio dihidratado	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.25
Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025
Cloruro de cobalto hexahidratado	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025
3. Hierro (Quelato de Hierro)		
Sulfato ferroso heptahidratado	FeSO ₄ . 7H ₂ O	27.8
Etilendiaminotetraacetato de disodio	Na ₂ EDTA	37.3
4. Vitaminas y Orgánicos		
Myo-inositol		100

Tiamina	Vitamina B1	0.1
Ácido nicotínico	Niacina	0.5
Piridoxina	Vitamina B6	0.5
Glicina		2.0
5. Aditivos necesarios		
Sacarosa		30 g/L
Agar		7000 mg/L (o 7 g/L)

Nota: (Quintero y Jaramillo, 2012).

1.19. Micropropagación En Cultivo *In Vitro*.

La micropropagación es una técnica de cultivo de tejidos vegetales que permite la multiplicación rápida y masiva de plantas a partir de pequeños fragmentos de tejido, denominados explantes, bajo condiciones controladas en laboratorio. Esta técnica se lleva a cabo en medios de cultivo estériles que contienen nutrientes esenciales, reguladores de crecimiento y factores específicos que estimulan la formación de nuevas plantas (George, 2020).

1.20. Fases Del Cultivo *In Vitro*.

El cultivo *in vitro* se divide en varias fases, cada una con objetivos específicos para garantizar la producción de plantas sanas y uniformes (Salgado, 2008).

1.20.1. Fase 0. Inicial.

Es la fase inicial del cultivo *in vitro*, el objetivo es facilitar la realización del cultivo y es muy recomendable para la eficacia del proceso (Orqueda, 2013). El primer paso es la selección de la planta madre la cual debe ser una planta certificada o que demuestre estar libre de patógenos que puedan ocasionar algún tipo de contaminación en el medio (Mroginski, 1991).

La selección del explante depende de la especie a cultivar, de la edad y desarrollo de la planta donadora, los cuales son factores estratégicos para un efectivo cultivo *in vitro*; en general los tejidos jóvenes y segmentos nodales en crecimiento activo, son la mejor

opción para la fase de establecimiento, además de que su cantidad es más accesible en las ramas de las plantas donadoras . (Mroginski, 2000).Una vez seleccionado el explante se continúa con el proceso de desinfección.

1.20.2. Desinfección.

El protocolo de desinfección busca garantizar el crecimiento óptimo del material vegetal, prevenir enfermedades y reducir en lo posible la cantidad superficial de patógenos; ya que el material vegetal proviene de diferentes hábitats, silvestres o controlados, se debe seleccionar los tipos de tratamientos más adecuados a utilizar (Orqueda, 2013).

Para plantas, especialmente de origen silvestre, es indispensable diseñar un programa de tratamientos con insecticidas, fungicidas y bactericidas con el objetivo de prevenir y combatir enfermedades y parásitos (Castillo, 2020).

La utilización de fungicidas se aplica principalmente a plantas silvestres, de las cuales se necesita la eliminación de hongos patógenos que se encuentran en las partes superficiales de los explantes, los fungicidas recomendados son los sistémicos de amplio espectro (Alfonso, 2008).

Como productos con actividad bactericida intensa y de amplio espectro se puede aplicar el Ácido Acético y Tetraciclina respectivamente, que ayudan a eliminar bacterias presentes en las áreas superficiales, (Martínez, 2013). Uno de los agentes de esterilización más utilizado es el hipoclorito sódico que tiene una concentración del 10% de componente activo; se usa diluido a una concentración final de 1 o 2%, siendo estas concentraciones bastante eficaces; existen especies muy sensibles a este agente por lo cual se recomienda la utilización de otro agente esterilizador químico, los cuales pueden ser hipoclorito cálcico, cloruro de mercurio, agua oxigenada, nitrato de plata, entre otros (Mroginski, 2000).

En varios protocolos se incluye una pre-esterilización con etanol al 70% y al 96% durante 5 a 10 segundos; cabe mencionar que el alcohol al 96 % es muy fuerte produciendo una excesiva deshidratación del material vegetal (Pérez, 2006).

Por la acción de los agentes de esterilización se pueden generar reacciones de hipersensibilidad de los explantes, al momento en que los tejidos vegetales se encuentran ante situaciones de estrés se estimula el metabolismo de los compuestos fenólicos, que son muy fácilmente oxidados y los productos provenientes de la oxidación resultan tóxicos para las células e incluso mejoran el proceso de oxidación, pudiendo convertirse en fuertes oxidantes por sí mismos (Mroginski, 2000).

El lavado de los explantes con agua esterilizada es un tratamiento previo antes de la siembra, que elimina la mayor cantidad de compuestos fenólicos, pero para un mejor control de estos compuestos, se puede acudir a su adsorción mediante carbón activado o polivinil pirrolidona; esta técnica es un tratamiento previo a la siembra o más comúnmente usado, incorporándolo al medio de cultivo. (Alfonso, 2008).

1.20.3. Control de contaminación en la sala de siembra.

La desinfección de la sala de siembra es una etapa fundamental en el cultivo *in vitro*, ya que los explantes son muy sensibles a la contaminación por microorganismos presentes en el ambiente. Por esta razón, se emplea la radiación ultravioleta (UV), especialmente del tipo UV-C, como una herramienta eficaz para reducir la presencia de bacterias, hongos y otros contaminantes en el área de trabajo. (Castillo, 2020)

La radiación UV actúa directamente sobre el material genético de estos microorganismos, dañando su ADN e impidiendo que puedan reproducirse, lo que disminuye considerablemente su presencia en el aire y en las superficies. De esta manera, se crea un ambiente más adecuado y seguro para la manipulación del material vegetal. (Garzon, 2018).

Sin embargo, es importante destacar que su uso debe realizarse en ausencia de personas, debido a que puede ser perjudicial para la salud. En conjunto con otras prácticas de asepsia, como la desinfección de instrumentos y el uso de cabinas de flujo laminar, la radiación UV contribuye significativamente a mejorar las condiciones de esterilidad y, por lo tanto, al éxito del cultivo *in vitro*. (Orqueda, 2013).

1.20.4. Fase 1. Establecimiento De Cultivo *In Vitro*.

Esta fase consiste en que el tejido vegetal se estabilice después del estrés causado por la incisión y la desinfección, y comience su desarrollo y adaptación al medio de cultivo, donde el tejido irá absorbiendo los reguladores de crecimiento y los nutrientes presentes en el medio de cultivo. (Orqueda, 2013).

Existen diferentes tipos de realizar esta fase, pero la que realizaremos será con la extracción de yemas.

1.20.5. Explante.

Según (Shary, 2015). Un explante es cualquier fragmento o porción de un organismo (planta, en este contexto) que se extrae cuidadosamente y se transfiere a un medio de cultivo artificial (como una placa de Petri o un tubo de ensayo) para que crezca y se desarrolle en condiciones controladas de laboratorio.

1.20.6. Influencia del tiempo de contacto del hipoclorito de sodio (NaClO) y formol en la desinfección de explantes.

El tiempo de exposición de los agentes desinfectantes es un factor crítico en el establecimiento de cultivos *in vitro*, ya que determina la eficacia en la eliminación de microorganismos sin comprometer la viabilidad del explante. El hipoclorito de sodio (NaClO) actúa principalmente como un agente oxidante, cuya acción es progresiva y depende del tiempo de contacto con el tejido vegetal, por lo que generalmente requiere periodos más prolongados para lograr una desinfección efectiva. En contraste, el formol (formaldehído) posee una acción más rápida y agresiva, basada en la desnaturalización de proteínas y la inactivación de enzimas, lo que le permite eliminar microorganismos en menor tiempo. Sin embargo, su alta toxicidad puede causar daños en los tejidos vegetales e implica riesgos para el operador, por lo que su uso debe ser cuidadosamente controlado en condiciones de laboratorio (Mroginski, 2000).

1.20.7. Uso de ácido ascórbico en el lavado de explantes y control de la oxidación.

Durante el establecimiento de cultivos *in vitro*, uno de los principales problemas es la oxidación de los explantes, la cual ocurre cuando los tejidos vegetales, al ser cortados o manipulados, liberan compuestos fenólicos que reaccionan con el oxígeno, provocando un oscurecimiento del tejido y, en muchos casos, su deterioro o muerte. Para reducir este problema, es común realizar un lavado previo de los explantes con agua destilada, con el fin de eliminar impurezas y parte de estos compuestos liberados. (Zar, 2010).

Adicionalmente, se emplea ácido ascórbico, el cual actúa como un agente antioxidante, evitando la oxidación de los compuestos fenólicos y protegiendo la viabilidad del tejido vegetal. Su uso contribuye a mantener los explantes en mejores condiciones fisiológicas, favoreciendo su establecimiento y desarrollo en el medio de cultivo. Este procedimiento ha sido ampliamente recomendado en protocolos de cultivo *in vitro* como una estrategia eficaz para disminuir la oxidación y mejorar el éxito del cultivo (Zar, 2010).

1.20.8. Agar:

Es una sustancia noble que ofrece soporte sin intervenir; una base transparente y firme que permite a los científicos observar el crecimiento de la vida en su forma más pura. Es el puente entre lo que no podemos ver y el mundo que podemos estudiar, actuando como un anfitrión generoso que sostiene los nutrientes necesarios para que una sola célula se convierta en una colonia visible al ojo humano. (Madigan, 2015).

1.20.9. Fase 2. Cultivo De Yemas.

Las yemas axilares y apicales están conformadas por células meristemáticas que son las responsables del crecimiento de la planta con capacidad de formar todos los tejidos y así generar plantas completas. Al cultivar meristemas en un medio adecuado se pueden obtener plantas completas de manera más rápida, en comparación con otras técnicas; además de ser un tejido que se perpetúa así mismo, lo que significa que se producen células con actividad meristemática. (Madigan, 2015).

Al aislar el meristemo apical se debe tener cuidado de no dañar la región subdistal, ya que la formación de yemas comienza cuando la incisión es profunda y afecta el tejido provascular; si este tejido permanece intacto se inicia la formación de hojas, lo que indica que los metabolitos necesarios para este desarrollo son transportados a través del parénquima de la médula y a través del tejido provascular (Zar, 2010).

Las yemas apicales y axilares generalmente producen plántulas en menor cantidad con respecto a otros explantes, pero con el beneficio de que son plántulas genéticamente fieles a la planta madre, es decir que no existe una variación somaclonal y se podría denominar como un proceso de clonación (Segui, 2010). La multiplicación de estos explantes no genera cambios trágicos en la estructura del tejido, debido a que no se desarrollan nuevos meristemos y las concentraciones de los reguladores de crecimiento son bajas, garantizando así la estabilidad genética del sistema. (Zar, 2010).

1.20.10. Multiplicación.

En esta etapa se estimula la proliferación de nuevos brotes o tejidos vegetales a partir del explante original. Se utilizan medios de cultivo enriquecidos con hormonas como las citocininas (por ejemplo, BAP o kinetina), que promueven la formación de múltiples brotes axilares o adventicios. Esta fase puede repetirse en varios subcultivos para obtener grandes cantidades de material vegetal. (Aries, 2020).

1.20.11. Fase De Elongación.

Esta fase puede variar dependiendo de los objetivos buscados, pero esta fase por separado tiene como propósito que el tejido cultivado alcance una longitud adecuada; en algunos protocolos la fase de elongación se la puede generar simultáneamente con la fase de multiplicación o ex vitro (Hurtado, 2001).

1.20.12. Enraizamiento.

Los brotes obtenidos en la etapa anterior se transfieren a un medio de cultivo con menor concentración de sales y reguladores de crecimiento, generalmente con auxinas como AIB o ANA, para inducir la formación de raíces. El éxito del enraizamiento depende

de factores como la concentración hormonal, el tipo de explante y el estado fisiológico del brote (William, 2000).

1.20.13. Aclimatación.

Finalmente, las plantas enraizadas se adaptan gradualmente a condiciones ambientales naturales. Se trasladan de ambientes controlados del laboratorio a viveros o invernaderos, donde se controla la humedad, la temperatura y la luz para minimizar el estrés fisiológico. Esta etapa es crítica, ya que las plantas micropropagadas presentan un sistema radicular delicado y una cutícula poco desarrollada. (William, 2000).

CAPITULO II MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1.Localización Geográfica.

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de fitopatología y cultivo *in vitro* de la Facultad De Ciencias Agrícolas Y Forestales de la Universidad autónoma Juan Misael Saracho”, Ubicado en el Departamento de Tarija, provincia Cercado, Zona el Tejar.

2.2.Ubicación Geográfica.

Ubicado geográficamente entre los paralelos 21° y 15’ de latitud sur y el meridiano 64° 21’ de longitud Oeste, con una altura promedio de 1850 m.s.n.m.

Anexo 2: Ubicación Del Laboratorio De Fitopatología Y Cultivo *In Vitro*.

2.3.Materiales.

Se utilizó diferentes equipos, reactivos y materiales y productos químicos de laboratorio para el ensayo de desinfección y establecimiento *in vitro*.

2.3.1. Material Vegetal.

Zarzamora: (*Rubus fruticosus* L.) Var. Variedad Rosborough.

2.3.2. De escritorio.

- Computadora.
- Impresora.
- Regla.
- Lápices.
- Borrador.
- Carpeta.
- Libreta de apuntes.
- Esferos.
- Papelería en general.

- Marcadores.

- Tijeras.

2.3.3. Equipos De Laboratorio.

- Autoclave.
- Cámara de flujo laminar.
- PH-metro.
- Balanzas de precisión.
- Microscopio.
- Agitador.
- Horno de esterilización.
- Horno microondas.

2.3.4. Materiales De Laboratorio.

- Cajas Petri.
- Vasos de vidrio.
- Pipeta.
- Probeta.
- Tubos de ensayo.
- Mechero.
- Frascos de vidrio.
- Encendedor.
- Marcador.
- Bisturi

2.3.5. Reactivos Químicos De Laboratorio.

- Medio de cultivo de Murashige & Skoog
- Medio de cultivo WPM
- BAP- Bencil Amino Purina.

- Kinetina
- Agar.
- Sacarosa.
- Alcohol.
- Hipoclorito de sodio.
- Agua destilada.

2.3.6. Equipo.

- Cabina de flujo laminar:
- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Refrigeradora.
- Termohigrómetro.
- Medidor de pH digital peachimetro.
- Calentador.

2.3.7. Instrumentos y procesos.

- Pinzas pequeñas y grandes: N° 3 y 4 y de 20cm.
- Hojas y mangos de Bisturíes: N°11 y N°20.
- Tijera de podar.

2.4. Metodología.

Para la presente investigación se siguió la metodología general del cultivo *in vitro* en sus Fase 0 (Selección del material vegetal) y Fase I (Establecimiento *in vitro*). (Pérez, 2015).

2.4.1. Fase 0. Selección Del Material Genético De Zarzamora.

El material vegetal que se seleccionó fue de plantas madre en campo, las mismas que cumplían con los parámetros fitosanitarios adecuados como sanidad y otros parámetros de calidad como el vigor y productividad.

Se inició con la búsqueda del material genético, para lo cual se logró encontrar una variedad traída por la Fundación Valles FDTA-Valles en la década de los 90 desde Estados Unidos de Norte América. Donde fueron trasladados a Tarija y mantenidos por 3 meses en bolsas con sustrato esperando su desarrollo para la obtención de explantes. El material recolectado fue el Sr. Prof. Fernando Perales en la comunidad de (Canasmoro). (Longitud: 78°38'59,51", Latitud: 1°19'5,82", Altitud: 3036,7 m. s. n. m).

Anexo 3: Obtención De Material Vegetal De Plantas Madre En Campo – Canasmoro.

2.4.2. Desinfección en campo:

Se desinfectó con alcohol al 70% la tijera de podar, se cortaron explantes de 40 cm de longitud de manera aséptica, colocando los explantes en sobres o bolsas de plástico para su envío al laboratorio de Fitopatología y Cultivo *in vitro*.

Anexo 4: Corte De Explantes De Zarzamora.

2.4.3. Desinfección en laboratorio:

Se deshojaron y se procedieron a lavar los explantes con la ayuda de un cepillo dental en una bandeja con agua de caño (grifo) y jabón líquido neutro, posteriormente se enjuagaron hasta no dejar restos de detergente y eliminar la mayor parte de impurezas.

2.4.4. Fase I. Establecimiento *In Vitro* De La Zarzamora.

La Fase I del cultivo *in vitro* contempla principalmente la definición del tipo de explante a emplear, el proceso de desinfección superficial de explantes, la siembra (inoculación) de explantes en los medios de cultivo contenidos en tubos de ensayo y la evaluación de su desarrollo en condiciones ambientales controladas, en el laboratorio, para que de este modo se logre obtener de manera exitosa vitroplantas de zarzamora.

En este contexto, con el objeto de determinar las condiciones óptimas de iniciación *in vitro* de zarzamora, se realizaron dos ensayos:

- **Primer ensayo**, destinado a optimizar el proceso de desinfección.
- **Segundo ensayo**, para evaluar la respuesta regenerativa de explantes de zarzamora frente a tres medios de cultivo.

2.5.Desarrollo Experimental.

2.5.1. Ensayo 1: Método De Desinfección.

Debido a la procedencia del material vegetal, que fueron recolectados en parcelas implantadas en la década de los 90, se ha desarrollado un ensayo inicial que permita comparar el efecto desinfectante de 2 principios activos para eliminar la presencia de microorganismos patógenos y contaminantes saprofiticos que puedan encontrarse en la superficie de los tejidos del material vegetal colectado.

2.5.2. Variables De Estudio 1 (Métodos De Desinfección).

Se emplearon como desinfectantes dos principios activos: Hipoclorito de Sodio (15%pc) y Formol (2%). Cada agente desinfectante fue aplicado dentro de un Método y protocolo independiente:

Tabla 2: Variables.

Tratamiento	Método	Concentración	Tiempo	Enjuague	Tiempo de enjuague	Número de enjuagues
Trat 1	NaClO	15 %	20 min	Agua Destilada Esterilizada	5 min	4
Trat 2	Formol	2 %	10 min	Agua Destilada Esterilizada	10 min	5

Fuente: Elaboración Propia.

1er. Método NaClO:

El procedimiento para el Método 1 fue el siguiente:

- Desinfección de Sala de siembra por UV durante 15 minutos.
- Limpieza de Cabina de flujo laminar, introducción de instrumental estéril, mecheros, agua destilada estéril, Alcohol 70% y solución de NaClO (15%pc)

- c) Acondicionamiento de material vegetal, se obtuvo segmentos nodales de 2.5cm.
- d) Inmersión de las explantes durante 60 segundos en alcohol 70 % v/v.
- e) Enjuague con agua destilada por 5 minutos.
- f) Inmersión por 20 minutos en Hipoclorito de Sodio al 15 % de solución comercial.
- g) Cuatro lavados en agua destilada estéril + Ácido ascórbico (100mg/L), cada uno de cinco minutos.

Luego del proceso de desinfección en NaClO, los segmentos nodales de zarzamora fueron inoculados en tubos Fisher con tapa, conteniendo 10ml de medio de cultivo PDA. Posteriormente fueron cultivadas en condiciones de:

- Fotoperiodo: 16 horas luz, 8 horas oscuridad, luz led blanca controlada por temporizador.
- Temperatura: 22°C $\pm$ 1, provista por acondicionador de aire tipo Split.

2do. Método Formol:

El procedimiento para el Método 2 fue el siguiente:

- a) Desinfección de Sala de siembra por UV durante 15 minutos.
- b) Limpieza de Cabina de flujo laminar, introducción de instrumental estéril, mecheros, agua destilada estéril, Alcohol 70% y solución de Formol (2%)
- c) Acondicionamiento de material vegetal, se obtuvo segmentos nodales de 2.5cm.
- d) Inmersión de las explantes durante 60 segundos en alcohol 70 % v/v.
- e) Enjuague con agua destilada por 5 minutos.
- f) Inmersión por 10 minutos en Formol al 2 %.
- g) Cinco lavados en agua destilada estéril + Ácido ascórbico (100mg/L), cada uno de 10 minutos.

Anexo 6: Proceso De Desinfección.

Luego del proceso de desinfección en Formol, los explantes de zarzamora fueron inoculados en tubos Fisher con tapa, conteniendo 10ml de medio de cultivo PDA. Posteriormente fueron cultivadas en condiciones de:

- Fotoperiodo: 16 horas luz, 8 horas oscuridad, luz led blanca controlada por

- temporizador.
- Temperatura: $22^{\circ}\text{C} \pm 1$, provista por acondicionador de aire tipo Split.

Tabla 3: Métodos De Desinfección NaClO Y Formol.

Tratamiento		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
NaClO 15%pc	T1										
Formol 2%	T2										

Fuente: Elaboración Propia.

2.5.3. Variable De Respuesta – Ensayo 1.

Las variables de respuesta del ensayo 1 son:

- Porcentaje De Contaminación,
- Porcentaje De Necrosamiento
- Porcentaje De Fenolización De Cada Unidad Experimental.

2.5.4. Ensayo 2: Regeneración In Vitro De La Zarzamora.

En el segundo ensayo se evaluó la regeneración de segmentos nodales de zarzamora en tres medios de cultivo con diez repeticiones (3x15), siendo los tratamientos distribuidos completamente al azar, con un total de 45 unidades experimentales. Donde cada unidad experimental compuesta por 1 tubo de ensayo conteniendo 10ml de medio de cultivo y un explante.

GRAFICA 2: 15 Repeticiones con los 3 tratamientos en total 45 unidades experimentales.

Número de Tubo	Tratamiento	Número de Tubo	Tratamiento	Número de Tubo	Tratamiento
1	Tratamiento 2	16	Tratamiento 1	31	Tratamiento 2

2	Tratamiento 1	17	Tratamiento 2	32	Tratamiento 1
3	Tratamiento 3	18	Tratamiento 1	33	Tratamiento 3
4	Tratamiento 1	19	Tratamiento 3	34	Tratamiento 1
5	Tratamiento 2	20	Tratamiento 2	35	Tratamiento 2
6	Tratamiento 3	21	Tratamiento 1	36	Tratamiento 3
7	Tratamiento 1	22	Tratamiento 2	37	Tratamiento 1
8	Tratamiento 2	23	Tratamiento 3	38	Tratamiento 2
9	Tratamiento 1	24	Tratamiento 3	39	Tratamiento 1
10	Tratamiento 3	25	Tratamiento 1	40	Tratamiento 3
11	Tratamiento 2	26	Tratamiento 2	41	Tratamiento 1
12	Tratamiento 1	27	Tratamiento 1	42	Tratamiento 2
13	Tratamiento 3	28	Tratamiento 3	43	Tratamiento 3
14	Tratamiento 2	29	Tratamiento 2	44	Tratamiento 1
15	Tratamiento 3	30	Tratamiento 1	45	Tratamiento 2

Fuente: (Gerardo J. 2026).

2.5.5. Modelo estadístico.

Para un DCA:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} : observation experimental

μ : media general.

τ_i : efecto del tratamiento

ϵ_{ij} : error experimental

2.5.6. Preparación De Los Medios De Cultivo.

La preparación de los medios de cultivo se realizó utilizando como base el medio Murashige y Skoog (MS) al 100%, debido a que este proporcionó los nutrientes necesarios para favorecer el desarrollo y regeneración de los explantes en condiciones *in vitro*. A este medio se le incorporaron reguladores de crecimiento vegetal en diferentes concentraciones, según los tratamientos establecidos en el ensayo.

Para su elaboración, primero se disolvieron las sales minerales y vitaminas del medio MS en agua destilada. Posteriormente, se añadió sacarosa como fuente de energía y los reguladores de crecimiento BAP y AIB de acuerdo con las concentraciones correspondientes a cada tratamiento. Luego, el pH del medio fue ajustado a 5,8, ya que este nivel favoreció la absorción de nutrientes y el adecuado crecimiento de los tejidos vegetales.

Después del ajuste de pH, se agregó agar para proporcionar consistencia sólida al medio de cultivo. Una vez obtenida la mezcla homogénea, el medio fue distribuido en tubos Fisher, colocando aproximadamente 10 ml. por unidad experimental.

Finalmente, los medios preparados fueron esterilizados en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión durante 20 minutos, con la finalidad de eliminar posibles microorganismos contaminantes. Posteriormente, los tubos se dejaron enfriar y solidificar en condiciones estériles hasta el momento de la siembra de los explantes.

2.5.7. Variables de estudio – Medios de Cultivo.

Las variables de estudio del segundo ensayo son tres medios de cultivo.

- **Medio IBk1: T1:** Murashigue y Skoog 100% + BAP 0.4 mg/L + AIB 0.2 mg/L
- **Medio IBk2: T2:** Murashigue y Skoog 100% + BAP 0.8 mg/L + AIB 0.3 mg/L
- **Medio IBk3: T3:** Murashigue y Skoog 100% + BAP 1.2 mg/L + AIB 0.4 mg/L

Las unidades experimentales fueron tubos Fisher, conteniendo 10ml de medio de cultivo y un explante (Segmento Nodal), todas fueron cultivadas en condiciones de:

- Fotoperiodo: 16 horas luz, 8 horas oscuridad, luz led blanca controlada por temporizador.
- Temperatura: $22^{\circ}\text{C} \pm 1$, provista por acondicionador de aire tipo Split.

De esta manera la distribución de tratamientos se muestra a continuación.

Tabla 4: Distribución De Tratamientos Completamente Al Azar (3x15).

Medio de cultivo	Trats.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R...	R15
IBk1: MS 100% + BAP 0.4mg + AIB 0.2mg	T1										
IBk2: MS 100% + BAP 0.8mg + AIB 0.3mg	T2										
IBk3: MS 100% + BAP 1.2mg + AIB 0.4mg	T3										

Fuente: Elaboración Propia.

2.5.8. Variables Respuestas.

a) Nivel De Regeneración.

La regeneración *in vitro* es un proceso morfogénico de formación de nuevos tejidos y órganos que son indicadores del grado de efectividad de la formulación de los medios de cultivo para estimular la generación de estas nuevas partes vegetales, en este sentido, el éxito o valor máximo que se puede lograr en una unidad experimental será 10, que significa la obtención de una vitroplanta. Por el contrario, la presencia de necrosamiento seguida de muerte celular tendrá un valor de cero (0), y condiciones intermedias serán registradas comparativamente, tomando en cuenta un tiempo definido.

Las unidades experimentales se evaluaron semanalmente, donde se observa diferentes niveles de regeneración, sin embargo, la evaluación definitiva para determinar la regeneración fue realizada el día 45.

El porcentaje de regeneración se evaluará de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{ de regeneración} = \frac{NE - ENR}{NE} * 100$$

Dónde:

NE= Número de Explantes

ENR= Explantes No Regenerados

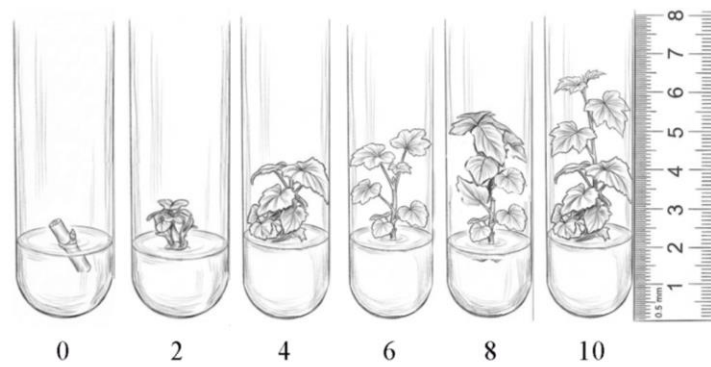
2.5.8.1. Número De Hojas De Vitroplantas.

El número de hojas de vitroplantas nos da un parámetro que servirá para determinar las futuras tasas de multiplicación, dada cuenta que cada hoja lleva en su axila una yema la cual será utilizada como explante para la fase de multiplicación, por tanto, esta información servirá para identificar los clones más eficientes.

2.5.8.2. Vigor De Vitroplantas.

Para evaluar el vigor de vitroplantas se empleará una plantilla propuesta por el Laboratorio de Fitopatología y cultivo *in vitro* (2026), donde, se considera que, si la regeneración ocurre de manera visible hasta los 45 días, posteriormente y hasta los 90 días podemos evaluar el vigor de vitroplantas, ya que, si bien la regeneración *in vitro* es un proceso morfogénico de formación de nuevos tejidos y órganos promovidos de manera artificial por la formulación de los medios de cultivo, las vitroplantas obtenidas pueden ser pequeñas, mediadas o comparativamente grandes. Este aspecto se debe tomar en cuenta en términos de eficiencia cualitativa.

Figura 1: Plantilla de evaluación del vigor de vitroplantas a 90 días de desarrollo.



Fuente: Laboratorio De Fitopatología Y Cultivo *In Vitro* (2026).

CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSION

3. RESULTADOS.

Para el establecimiento *in vitro* de la Zarzamora (*Rubus fruticosus* L.) (Var. Rosborough), se realizaron dos ensayos, en los cuales se emplearon PDA y tres medios de cultivo: IBk1(T1), IBk2 (T2) e IBk3 (T3) como ya se mencionó anteriormente.

3.1. Ensayo N° 1: Métodos De Desinfección De Explantes De Zarzamora.

El ensayo fue realizado el 28 de marzo de 2025, para lo cual, el día anterior se realizó la recolección de muestras vegetales de zarzamora de la plantación en la Propiedad del Sr. Prof. Fernando Perales (Canasmoro).

Las muestra preparadas e inoculadas en tubos de ensayo con PDA, fueron cultivadas en sala de crecimiento por 30 días.

Tratamiento		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
NaClO 15%pc	T1	SC	SC	SC	SC	CHB	SC	CHB	SC	SC	SC
Formol 2%	T2	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC

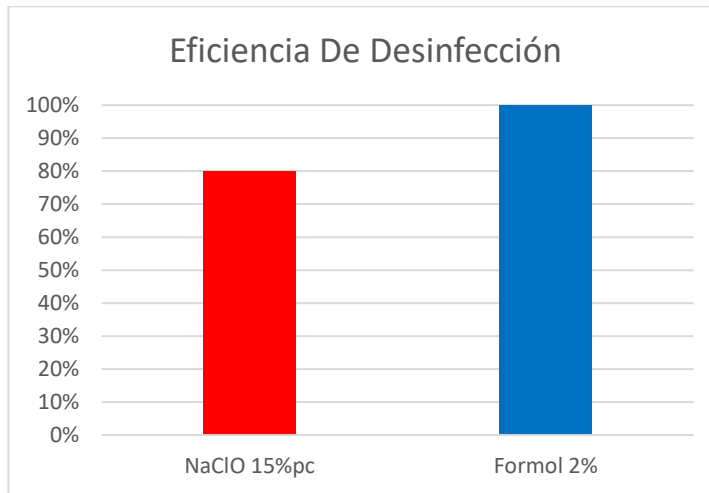
SC: Sin Contaminación **CHB:** Cont. por Hongos/bacterias.

Tabla 2: Resumen Resultados De Eficiencia De Desinfección: NaClO 15%pc Vs. Formol 2% en PDA.

Tratamiento		Total, contaminados	% contaminación	Eficiencia
NaClO 15%pc	T1	2/10	20	80%
Formol 2%	T2	0/10	0	100%

Fuente: Elaboración Propia.

Gráfica 3: Eficiencia De Desinfección: NaClO 15%pc Vs. Formol 2% En PDA.



Fuente: Elaboración Propia.

La eficiencia de desinfección del tratamiento con Formol (2%) demostró ser eficiente al 100% y cero unidades experimentales contaminadas.

La eficiencia de desinfección del tratamiento con NaClO (15%pc) demostró ser eficiente al 80% y 2 unidades experimentales contaminadas (20%).

3.2. Discusión.

De los resultados podemos indicar que, si bien el tratamiento con formol logró un 100% de eficiencia en la desinfección, es pertinente mencionar que su uso requiere extremo cuidado ya que es un producto volátil, tóxico y muy peligroso en ambientes con poca o nula ventilación. Por lo que, para realizar el ensayo de eficiencia de regeneración de explantes se decidió optar por el método de desinfección con NaClO (15%pc), considerando su eficiencia de 80% y la seguridad que ofrece al trabajar en ambientes cerrados como lo son las salas de siembra de los laboratorios de cultivo de tejidos vegetales.

3.3.Ensayo N° 2. Eficiencia Regenerativa De Explantes De Zarzamora En Tres Medios De Cultivo.

3.3.1. Nivel De Regeneración.

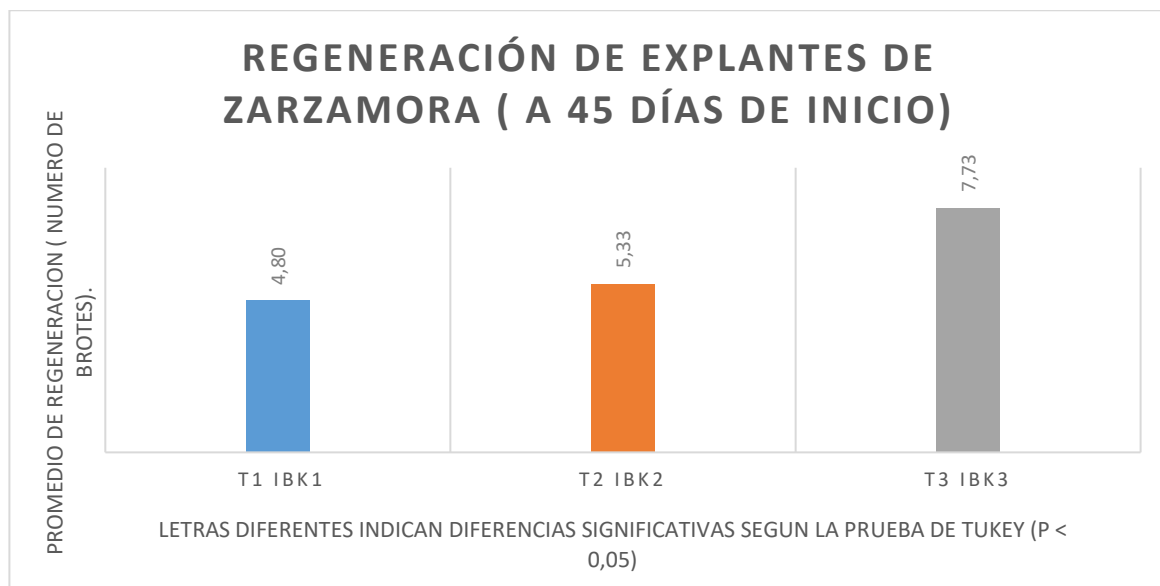
A continuación, la tabla N°12 muestra los resultados de regeneración de explantes de zarzamora en tres medios de cultivo a los 45 días después de la siembra.

Tabla 5: Regeneración De Explantes De Zarzamora (A 45 Días Del Inicio).

REPETICIONES	TRATAMIENTOS		
	T1	T2	T3
	4	6	10
	5	7	8
	5	6	7
	5	5	10
	4	5	9
	6	7	10
	5	4	5
	4	3	9
	5	3	8
	3	7	6
	4	4	8
	4	6	7
	5	5	5
	6	5	10
	7	7	4
Promedio	4,80	5,33	7,80
SUMA	72	80	116

Fuente: Elaboración Propia.

Gráfica 4: regeneración de explantes de zarzamora (45 días de inicio)



Fuente: Elaboracion Propia.

La presente Gráfica nos muestra que el mejor promedio de los tratamientos para la variable Regeneración de explantes de Zarzamora (a 45 días del inicio). Observamos que: T3 (7.73) es Mayor, T2 (5.33) Intermedio y T1 (4.80) Menor.

Tabla 6: (ANNOVA) Regeneración De Explantes De Zarzamora (A 45 Días Del Inicio).

Fuente De Variación (FV)	Grados De Libertad Gl	Suma De Cuadrados Sc	Cuadrado Medio Cm	Relación F Fc**	Ft	
					5%	1%
TOTAL	44	171,9				
TRATAMIENTOS	2	73,2	36,6	15,6**	3,2	5,2
ERROR	42	98,7	2,3			

Fuente: Elaboración Propia.

El análisis de varianza realizado para la variable regeneración de explantes de zarzamora (*Rubus fruticosus* L.) mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados (medios de cultivo).

El valor de **F calculada (15.6)** fue considerablemente mayor que el valor esperado del error, lo que indica que los tratamientos ejercieron un efecto significativo sobre la regeneración de explantes. Esto demuestra que al menos uno de los medios de cultivo difiere estadísticamente de los demás en su capacidad para inducir la regeneración *in vitro*.

La variación observada entre tratamientos ($SC = 73.2$) fue superior a la variación atribuida al error experimental ($SCe = 98.67$), distribuida en más grados de libertad), lo que refuerza la evidencia de un efecto real de los medios de cultivo y no producto del azar.

Por lo que pasamos a realizar una prueba de comparación de medias.

Tabla 7: Comparación De Medias (Tukey).

Comparación	Diferencia	Significativa
T3 – T2	$7.73 - 5.33 = 2.40$	Sí
T3 – T1	$7.73 - 4.80 = 2.93$	Sí
T2 – T1	$5.33 - 4.80 = 0.53$	No

Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 8: Letras De Tukey.

Comparación	Diferencia	Significativa
T3	7.73	A
T2	5,33	B
T1	4.80	B

Fuente: Elaboración Propia.

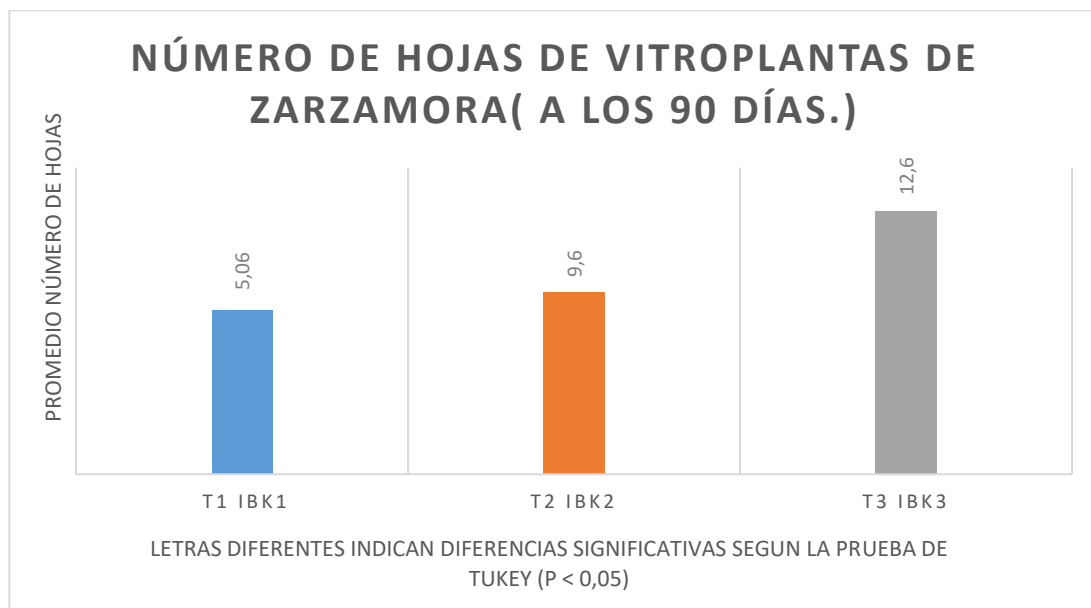
La prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$) mostró que el tratamiento T3 (7.73) fue estadísticamente superior, conformando un grupo independiente (a), mientras que los tratamientos T2 (5.33) y T1 (4.80) no presentaron diferencias significativas entre sí, agrupándose en el mismo grupo (b).

Tabla 9: Número De Hojas De Vitroplantas (A Los 90 Días).

REPETICIONES	TRATAMIENTOS		
	TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3
	5	8	11
	7	11	14
	4	9	10
	5	12	12
	6	10	15
	5	11	12
	5	8	13
	6	10	11
	4	9	15
	4	9	14
	5	11	13
	5	8	13
	6	9	10
	4	9	15
	5	10	12
	Promedio	5,06	9,6
	SUMA	76	144
			190

Fuente: Elaboración Propia.

Gráfica 5: Número de hojas de vitroplantas de zarzamora (a los 90 días)



Fuente: Elaboración Propia.

La presente grafica nos muestra que el mejor promedio de los tratamientos para la variable número de hojas de vitroplantas (a los 90 días). Observamos que: T3 (12,6) Mayor, T2 (9,6) Intermedio T1 (5,06) Menor.

Tabla 10: (ANOVA). Número De Hojas De Vitroplantas (A Los 90 Días).

Fuente De Variación FV	Grados de libertad Gl	Suma de cuadrados SC	Cuadrado medio CM	Relación F Fc**	Ft	
					5%	1%
TOTAL	44	512,4				
TRATAMIENTOS	2	438,6	219,3	124,7**	3,2	5,2
ERROR	42	73,9	1,8			

Fuente: Elaboración Propia.

El análisis de varianza (ANOVA) aplicado al número de hojas de vitroplantas de (*Rubus fruticosus* L.) a los 90 días mostró diferencias altamente significativas entre los tres medios de cultivo evaluados (T1, T2 y T3).

El valor de **F calculado** ($F = 124.17$), fue ampliamente superior al valor de **F tabulado** ($F_{0.05;5,2} \approx 3.22$), lo que indica que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos al nivel de significancia del 5%. y 1%.

Por lo tanto, se **rechaza la hipótesis nula (H_0)**, que establece que no existen diferencias entre los medios de cultivo, y se acepta la hipótesis alternativa (**H_1**), concluyendo que el tipo de medio de cultivo influye significativamente en el número de hojas producidas en las vitroplantas.

Tabla 11: Comparación de medias Tukey.

Comparación	Diferencia	Significativa
T3 – T2	$12,6 - 9,6 = 3$	Sí
T3 – T1	$12,6 - 5,06 = 7,54$	Sí
T2 – T1	$9,6 - 5,06 = 4,54$	No

Fuente: Elaboración Propia.

Diferencias entre dos medias cualquiera que sea mayor al valor de Tukey se considera significativa.

Tabla 12: Letras de Tukey.

Comparación	Diferencia	Significativa
T3	12,6	A
T2	9,6	B
T1	5,06	C

Fuente: Elaboración Propia.

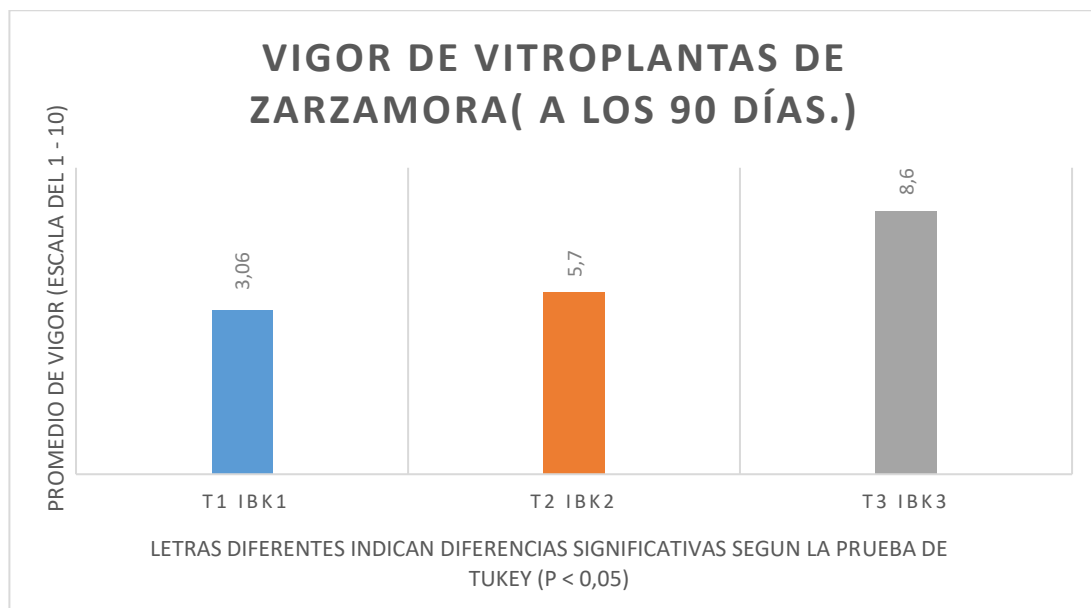
La prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$), evidenció diferencias significativas entre todos los tratamientos evaluados. El tratamiento T3 (12.67) presentó el mayor valor promedio, seguido por T2 (9.60) y finalmente T1 (5.07), conformando tres grupos estadísticamente diferentes (a, b y c, respectivamente).

Tabla 13: Vigor De Vitroplantas (A Los 90 Días).

REPETICIONES	TRATAMIENTOS		
	TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3
	3	6	8
	3	5	9
	3	6	8
	4	5	9
	2	7	10
	3	5	8
	3	5	9
	3	6	9
	4	6	10
	2	6	9
	3	6	8
	3	7	8
	3	5	7
	4	7	10
	3	4	8
Promedio	3,06	5,7	8,6
SUMA	46	86	130

Fuente: Elaboración Propia.

Gráfica 6: Vigor de vitroplantas de zarzamora (a los 90 días).



Fuente: Elaboracion propia.

La presente grafica nos muestra que el mejor promedio de los tratamientos para la variable Vigor de vitroplantas (a los 90 días). Observamos que: T3 (8,6) Mayor, T2 (5,7) Intermedio y T1 (3,06) Menor.

Tabla 14:(ANOVA) Vigor De Vitroplantas (A Los 90 Días).

Fuente de variación FV	Grados de libertad Gl	Suma de cuadrados SC	Cuadrado Medio CM	Relación F F _c **	F-tabulada	
					5%	1%
TOTAL	44	262,6				
TRATAMIENTOS	2	235,4	117,7	181,7**	3,2	5,2
ERROR	42	27,2	0,6			

Fuente: Elaboración Propia.

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos evaluados en el vigor de vitroplantas de (*Rubus fruticosus* L.). a los 90 días. El valor de **F calculado** fue significativamente mayor que el **F tabulado** al 5% de probabilidad, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se concluye que existen diferencias estadísticas entre los medios de cultivo.

Tabla 15: Comparación De Medias (Tukey).

Diferencias entre dos medias cualquiera que sea mayor al valor de Tukey se considera significativa.

Comparación	Diferencia	Significativa
T3 – T2	$8,6 - 5,7 = 2,9$	Sí
T3 – T1	$8,6 - 3,06 = 5,54$	Sí
T2 – T1	$5,7 - 3,06 = 2,54$	No

Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 16: Letras de Tukey.

Comparación	Diferencia	Significativa
T3	8,6	A
T2	5,7	B
T1	3,06	C

Fuente: Elaboración Propia.

La prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$), mostró que el tratamiento T3 fue significativamente superior, mientras que T2 y T1 no presentaron diferencias estadísticas entre sí. El tratamiento T3 (8,6) presentó el mayor promedio, seguido por T2 (5.7) y T1 (3.06), conformando tres grupos estadísticamente diferentes (a, b y c),

respectivamente el rendimiento de T1 sugiere que el medio basal o con menor suplementación hormonal limita la capacidad de respuesta de los explantes.

3.4.Comparación general de los resultados.

En relación al ensayo de desinfección, el tratamiento con formol al 2% alcanzó un 100% de eficiencia, superando al hipoclorito de sodio (NaClO al 15%), que presentó un 80% de desinfección. Estos resultados son consistentes con lo señalado por (Pérez, 2006) y (Martínez, 2013), quienes mencionan que los agentes químicos de amplio espectro tienen alta eficacia en la eliminación de contaminantes superficiales. Sin embargo, tal como se describe en el marco teórico, el uso de compuestos altamente tóxicos puede generar riesgos en el manejo y afectar la viabilidad del tejido vegetal. En este sentido, la decisión de utilizar NaClO en etapas posteriores es coherente con lo indicado por (Orqueda, 2013), quien destaca la importancia de seleccionar desinfectantes eficaces pero compatibles con la supervivencia del explante.

Respecto a la regeneración de explantes (45 días), el análisis de varianza mostró diferencias significativas entre tratamientos, siendo el tratamiento T3 estadísticamente superior. Este comportamiento puede explicarse por lo indicado por (Gamborg, 1976), quien establece que el éxito del cultivo *in vitro* depende principalmente de la composición del medio nutritivo y de su adecuación a las necesidades del tejido vegetal. Asimismo, el mejor desempeño de T3 sugiere una formulación más adecuada en términos de macro y micronutrientes, lo cual coincide con lo mencionado por (BROWN 2000), sobre la importancia de estos elementos en el crecimiento celular.

Además, el mayor nivel de regeneración observado en T3 puede estar relacionado con un balance más eficiente de reguladores de crecimiento, especialmente citoquininas, las cuales, según (Sharry, 2015), estimulan la división celular y la formación de brotes. Este resultado también es coherente con lo señalado por (Fichet, 2017), quien indica que la interacción hormonal es determinante en el desarrollo de los cultivos *in vitro*.

En cuanto a la variable número de hojas (90 días), el tratamiento T3 presentó valores significativamente superiores, seguido por T2 y finalmente T1. Estos resultados concuerdan con lo descrito por (Hurtado 2001), quien señala que un medio de cultivo

adecuado no solo favorece la regeneración inicial, sino también el crecimiento y desarrollo posterior de los tejidos, incluyendo la formación de estructuras vegetativas como hojas. Asimismo, el suministro adecuado de carbohidratos (sacarosa) descrito por (Zuñiga, 2023), es fundamental para el desarrollo foliar, considerando que los cultivos *in vitro* dependen de fuentes externas de energía.

En relación al vigor de las vitroplantas, los resultados también mostraron diferencias altamente significativas, con T3 como el tratamiento de mejor desempeño. Este comportamiento puede atribuirse a una adecuada disponibilidad de nutrientes, reguladores de crecimiento y condiciones del medio, lo cual coincide con lo establecido por (Garzon, 2018) y (Seguí 2023), quienes destacan que el cultivo *in vitro* permite obtener plantas de alta calidad fisiológica cuando se optimizan las condiciones del medio y del entorno de cultivo.

Por otro lado, el menor rendimiento observado en el tratamiento T1 en todas las variables evaluadas puede explicarse por su menor concentración de sales (MS al 50%), lo cual, según (Hurtado 2001), puede limitar el crecimiento en ciertas especies cuando los requerimientos nutricionales no son satisfechos completamente. Esto demuestra que, aunque las reducciones en la concentración del medio pueden ser útiles en algunas fases, no siempre son adecuadas para maximizar la regeneración y el desarrollo.

Finalmente, los resultados obtenidos confirman lo señalado por (George, 2020) y (Aries, 2020), quienes indican que la micropropagación depende en gran medida de la optimización de cada una de sus fases, especialmente del establecimiento y multiplicación, donde el medio de cultivo y la respuesta del explante son determinantes para el éxito del proceso.

CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES.

1. El tratamiento con Formol al 2% (T2). Presentó la mayor eficiencia en la desinfección de explantes de (*Rubus fruticosus* L.), alcanzando 100% de efectividad sin presencia de contaminación.
2. En ambas variables evaluadas, el tratamiento T3 presentó los mejores resultados, alcanzando los mayores valores promedio en número de hojas y vigor, lo que indica un mejor desempeño en el desarrollo morfogénico de las vitroplantas.
3. El tipo de medio de cultivo influye significativamente en el vigor de vitroplantas de (*Rubus fruticosus* L.), siendo el tratamiento T3 el más eficiente bajo las condiciones evaluadas.
4. El tratamiento T1 presentó los valores más bajos, lo que indica que no proporciona condiciones óptimas para el desarrollo de las vitroplantas en comparación con los otros medios evaluados.
5. Se concluye que el tipo de medio de cultivo influye significativamente en el crecimiento y desarrollo *in vitro* de (*Rubus fruticosus* L.), determinando diferencias en el número de hojas y el vigor de las plantas.

4.2. RECOMENDACIONES.

1. Se recomienda el uso de Formol al 2% como agente desinfectante en el establecimiento *in vitro* de (*Rubus fruticosus* L.), debido a su mayor efectividad en el control de contaminación.
2. Incluir en futuros estudios la evaluación del efecto de los desinfectantes sobre la viabilidad y supervivencia de los explantes, ya que una alta desinfección no siempre garantiza mejor crecimiento.
3. Se recomienda el uso del medio de cultivo T3 para la micropropagación de (*Rubus fruticosus* L.), debido a que mostró el mejor desempeño en cuanto a vigor y desarrollo foliar.
4. Evaluar en futuros estudios otras variables de crecimiento, como longitud de brotes, número de raíces y tasa de supervivencia en aclimatación, para complementar la información obtenida.
5. Ampliar el estudio incorporando diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (auxinas y citoquininas) para determinar combinaciones más eficientes.