



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR  
DE LOS REYES

## MAESTRÍA EN AGROBIOTECNOLOGÍA

PROTOCOLO PARA MICROPROPAGACIÓN DE ZARZAMORA (*Rubus*  
subgénero *Eubatus*) VARIEDAD TUPY MEDIANTE UN SISTEMA DE  
INMERSIÓN TEMPORAL

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN AGROBIOTECNOLOGÍA

## PRESENTA:

I.I.A. Adriana Esperanza Ruiz Amézquita

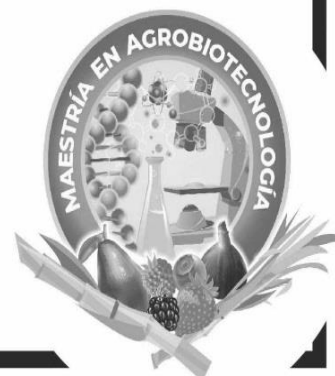
DIRECTOR(A) DE TESIS:

M.C. Gamaliel Valdivia Rojas

CO-DIRECTORA DE TESIS:

D.C. Ma. Del Carmen Rocha Granados

Los Reyes de Salgado, Michoacán, octubre, 2022





## LICENCIA DE USO DE OBRA

**LICENCIA DE USO OTORGADA POR** Adriana Esperanza Ruiz Amézquita, de nacionalidad mexicana mayor de edad, con domicilio ubicado en Parota 112-A col. Arboledas, Zamora Michoacán, en mi calidad de titular de los derechos patrimoniales y morales y autor de la tesis denominada Protocolo para micropropagación de zarzamora (*Rubus* Subgénero *Eubatus*) variedad Tupi mediante un Sistema De Inmersión Temporal en adelante "**LA OBRA**" quien para todos los fines del presente documento se denominará "**EL AUTOR Y/O EL TITULAR**", a favor del Instituto Tecnológico Superior de Los Reyes del Tecnológico Nacional de México, la cual se registrará por las cláusulas siguientes:

**PRIMERA –OBJETO:** "**EL AUTOR Y/O TITULAR**", mediante el presente documento otorga al Instituto Tecnológico Superior de Los Reyes del Tecnológico Nacional de México, licencia de uso gratuita e indefinida respecto de "**LA OBRA**", para almacenar, preservar, publicar, reproducir y/o divulgar la misma, con fines académicos, por cualquier medio en forma física y a través del repositorio institucional y del repositorio nacional, éste último consultable en la página: (<https://www.repositorionacionalcti.mx/>).

**SEGUNDA - TERRITORIO:** La presente licencia se otorga, de manera no exclusiva, sin limitación geográfica o territorial alguna, de manera gratuita e indefinida.

**TERCERA -ALCANCE:** La presente licencia contempla la autorización para formato uso de "**LA OBRA**" en cualquier formato o soporte material y se extiende a la utilización, de manera enunciativa más no limitativa a los siguientes medios: óptico, magnético, electrónico, virtual (red), mensaje de datos o similar conocido por conocerse.

**CUARTA – EXCLUSIVIDAD:** La presente licencia de uso aquí establecida no implica exclusividad en favor del Instituto Tecnológico Superior de Los Reyes; por lo tanto, "**EL AUTOR Y/O TITULAR**" conserva los derechos patrimoniales y morales de "**LA OBRA**", objeto del presente documento.

**QUINTA – CRÉDITOS:** El Instituto Tecnológico Superior de Los Reyes y/o el Tecnológico Nacional de México reconoce que el "**AUTOR Y/O TITULAR**" es el único, primigenio y perpetuo titular de los derechos morales sobre "**LA OBRA**"; por lo tanto, siempre deberá otorgarle los créditos correspondientes por la autoría de la misma.

**SEXTA – AUTORÍA:** "**EL AUTOR Y/O TITULAR**" manifiesta ser el único titular de los derechos de autor que derivan de "**LA OBRA**" y declara que el material objeto del presente fue realizado por él, sin violentar o usurpar derechos de propiedad intelectual de terceros; por lo tanto, en caso de controversia sobre los mismos, se obliga a ser el único responsable.



Dado en la Ciudad de Los Reyes de Salgado, a los 03 días del mes de Octubre de 2022.

“EL AUTOR Y/O TITULAR”

“EL INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE LOS REYES”

ADRIANA ESPERANZA RUIZ AMÉZQUITA

MTRO. HUGO VALDEZ VARGAS  
DIRECTOR GENERAL DEL ITSLR



Instituto Tecnológico Superior de Los Reyes

LOS REYES, MICH., A 10 DE OCTUBRE DEL 2022.

**ASUNTO: SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN  
PARA IMPRESIÓN DE LA TESIS**

**ING. EDUARDO PULIDO TORO**  
**COORDINADOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO**  
**P R E S E N T E**

Por medio del presente le informo que ha sido revisado y liberado el siguiente proyecto para su autorización de impresión:

a) Nombre del Sustentante:	RUIZ AMÉZQUITA ADRIANA ESPERANZA
b) Maestría en:	Maestría en Agrobiotecnología
c) Matricula:	M20060413
d) Nombre del Proyecto:	PROTOCOLO PARA MICROPROPAGACIÓN DE ZARZAMORA ( <i>Rubus</i> subgénero <i>Eubatus</i> ) VARIEDAD TUPY MEDIANTE UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL
e) Producto	Tesis

Agradezco de antemano su valioso apoyo en esta importante actividad para la formación profesional de nuestros egresados.

**ATENTAMENTE:**  
**Miembros del Comité Tutorial:**

			
M.C. GAMALIEL VALDIVIA ROJAS.	D.C. MA. DEL CARMEN ROCHA GRANADOS	M.C. YOLANDA RUIZ SUÁREZ	D.C. CRUZ ERNESTO AGUILAR RODRÍGUEZ
Director de Tesis	Codirector de Tesis	Tutor 1	Tutor 2

La presente tesis, titulada: Protocolo para micropropagación de Zarzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*) variedad “Tupy” mediante un sistema de inmersión temporal, realizada por la alumna: Adriana Esperanza Ruiz Amézquita, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN AGROBIOTECNOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR:

DIRECTOR DE

TESIS \_\_\_\_\_

M.C. GAMALIEL VALDIVIA ROJAS

CODIRECTOR \_\_\_\_\_

D.C. MA. DEL CARMEN ROCHA GRANADOS

ASESOR 1: \_\_\_\_\_

M.C. YOLANDA RUIZ SUÁREZ

ASESOR 2: \_\_\_\_\_

D.C. CRUZ ERNESTO AGUILAR RODRÍGUEZ

Los Reyes de Salgado, Michoacán, a Octubre de 2022

### **Síntesis curricular**

Adriana Esperanza Ruiz Amézquita es originaria de Zamora Michoacán, nació el 18 de octubre de 1994. En julio del año 2012 ingresó al Tecnológico de Estudios Superiores de Zamora, en Zamora, Michoacán y egresó con el Título de Ingeniero en Industrias Alimentarias, en el 2017. De marzo de 2017 a marzo de 2018 laboró en la empresa N&R Berry Farms SPR de RL de CV ubicada en Jacona Michoacán, posteriormente de marzo de 2018 a agosto de 2018, fungió como supervisor de producción en el laboratorio de cultivo de tejidos de la empresa Zarzara Biofarm S de RL. Realizó la maestría en Agrobiotecnología en el Instituto Tecnológico Superior de Los Reyes Michoacán, desde 2020 hasta el 2022. Durante el periodo que cursó sus estudios de posgrado fue ponente en un evento científico: XXVII Congreso Nacional y VIII Internacional de Fitogenética. El estudiante egresa con un promedio de 98.

## **Agradecimientos**

En primera instancia, agradezco al Posgrado en Agrobiotecnología del Instituto Tecnológico Superior de los Reyes, por permitirme cursar su programa de estudios, por los excelentes profesores investigadores con los que cuenta, los cuales me acompañaron a lo largo de este trayecto, así como también por brindarme todos los recursos y herramientas necesarias para llevar a cabo la investigación.

Agradezco al tutor principal del proyecto, M.C. Gamaliel Valdivia Rojas, quien, con sus aportes profesionales, constancia, paciencia y apoyo incondicional, formó parte fundamental de la investigación y formación académica.

Doy gracias a los miembros del apreciable comité tutor: la M.C. Yolanda Ruiz Suarez, el D.C. Cruz Ernesto Aguilar Rodríguez y a la D.C. Ma. Del Carmen Rocha Granados, quienes fueron claves en la generación de esta investigación, al compartir sus conocimientos y experiencias.

Agradezco a mis padres, por darme la fuerza que se necesita para continuar esta travesía hasta el final, su apoyo incondicional y su inmenso amor. También a mis familiares y amigos les doy gracias por estar ahí para mí y darme ánimos para seguir.

A mi prometido, le agradezco su apoyo incondicional, el haber sido mi soporte en los momentos más difíciles, su amor y comprensión.

De manera general a todos los que contribuyeron con su conocimiento o simplemente con una palabra de aliento, a que este proyecto fuera posible, les agradezco infinitamente y externo que este logro también es suyo.

## **Dedicatoria**

A mi madre, que con su amor y comprensión me dio la fuerza para salir adelante en todo momento.

A la memoria de mi padre, que estaría muy contento de verme realizada al concluir esta etapa, además de que su deseo siempre fue que me siguiera superando.



## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	10
ÍNDICE DE CUADROS .....	12
RESUMEN.....	13
ABSTRACT .....	14
INTRODUCCIÓN.....	15
HIPÓTESIS .....	18
OBJETIVOS.....	18
I. MARCO TEÓRICO .....	19
1.1 PLANTA DE ZARZAMORA .....	19
1.1.1 IMPORTANCIA DE LA ZARZAMORA COMO CULTIVO .....	20
1.1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA ZARZAMORA .....	21
1.1.3 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA ZARZAMORA.....	22
1.1.4 PROPAGACIÓN DE LA ZARZAMORA.....	22
1.2 FUNDAMENTOS DEL CULTIVO DE TEJIDO IN VITRO .....	23
1.3 IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE TEJIDO IN VITRO Y SUS LIMITACIONES .....	24
1.4 TIPOS DE REGENERACIÓN DE PLANTAS EN CULTIVO DE TEJIDO IN VITRO.....	24
1.4.1 ORGANOGÉNESIS .....	25
1.4.2 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	26
1.5 ETAPAS DEL CULTIVO IN VITRO.....	27
1.5.1 SELECCIÓN DE LA PLANTA MADRE Y RECOLECCIÓN DE LOS EXPLANTES .....	27
1.5.2 FASE DE ESTABLECIMIENTO EN CULTIVO DE TEJIDO IN VITRO	28
1.5.3 FASE DE MULTIPLICACIÓN EN CULTIVO DE TEJIDO IN VITRO	29

1.5.4	FASE DE ENRAIZAMIENTO EN CULTIVO DE TEJIDO IN VITRO	31
1.5.5	FASE DE ACLIMATACIÓN DEL CULTIVO DE TEJIDO IN VITRO A CONDICIONES EX VITRO.....	32
1.6	MEDIO DE CULTIVO .....	34
1.6.1	COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO .....	34
1.6.2	TIPOS DE MEDIOS DE CULTIVO.....	36
1.7	REGULADORES DE CRECIMIENTO .....	37
1.7.1	TIPOS DE REGULADORES DE CRECIMIENTO .....	37
1.7.2	IMPORTANCIA DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO.	40
1.8	SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL .....	40
1.8.1	FUNDAMENTO DE LOS SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL.....	41
1.8.2	TIPOS DE SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL.....	41
1.9	ESTUDIOS PREVIOS .....	44
II.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
2.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	47
2.1.1	SELECCIÓN DE LA PLANTA MADRE .....	47
2.1.2	DESINFECCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO. ....	48
2.1.3	ELABORACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO PARA FASE DE ESTABLECIMIENTO .....	51
2.1.4	SIEMBRA DEL MATERIAL BIOLÓGICO .....	51
2.2	ARMADO DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL .....	52
2.3	EVALUACIÓN DE FRECUENCIAS DE INMERSIÓN EN SISTEMA BIT CON LOS EXPLANTES DE ZARZAMORA .....	54
2.4	EVALUACIÓN DE UN BACTERICIDA COMERCIAL PPM EN MEDIO DE CULTIVO BAJO UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL.....	56
2.5	EVALUACIÓN DE UN BACTERICIDA COMERCIA PPM EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL CON EXPLANTES DE ZARZAMORA.....	56

2.6 EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE SALES MS PARA LA PLANTA DE ZARZAMORA EN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL. ....	57
2.7 EVALUACIÓN DEL EFECTO LA CITOQUININA BAP (6-BENZILAMINOPURINA) EN LA ORGANOGÉNESIS DE PLANTA DE ZARZAMORA PARA SU MICROPROPAGACIÓN.....	57
2.8 EVALUACIÓN COMPARATIVA ENTRE PLANTA EN MEDIO DE CULTIVO SEMISÓLIDO Y EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL BAJO DOS CONCENTRACIONES DE BAP.....	57
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	59
3.1 DESINFECCIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE YEMAS DE ZARZAMORA.....	59
3.2 ARMADO DEL SISTEMA.....	60
3.3 EVALUACIÓN DE FRECUENCIAS DE INMERSIÓN EN SISTEMA BIT CON LOS EXPLANTES DE ZARZAMORA .....	61
3.4 EVALUACIÓN DE UN BACTERICIDA COMERCIAL PPM EN MEDIO DE CULTIVO SIN EXPLANTES Y BAJO UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL .....	64
3.5 EVALUACIÓN DE UN BACTERICIDA COMERCIA PPM EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL CON EXPLANTES DE ZARZAMORA.....	65
3.6 EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE SALES MS PARA LA PLANTA DE ZARZAMORA EN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL.....	66
3.7 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CITOQUININA BAP (6-BENZILAMINOPURINA) EN LA ORGANOGÉNESIS DE PLANTA DE ZARZAMORA PARA SU MICROPROPAGACIÓN.....	67
3.8 EVALUACIÓN COMPARATIVA ENTRE PLANTA EN MEDIO DE CULTIVO SEMISÓLIDO Y EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL BAJO DOS CONCENTRACIONES DE BAP.....	73
IV. CONCLUSIONES.....	76
V. RECOMENDACIONES .....	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78
ANEXOS.....	87

ANEXO 2 COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG .....	91
ANEXO 3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS EXPERIMENTOS .....	92

## Índice de Figuras

Página

Figura 1. Hectáreas sembradas de zarzamora en México en los últimos quince años. (SIAP 2020).	20
Figura 2. Tipos de regeneración de plantas en cultivo de tejido <i>in vitro</i> , modificado de Contreras (2016).	27
Figura 3. Sistemas de inmersión temporal. A), B), C) y D).	42
Figura 4. Obtención y crecimiento de la planta madre.	47
Figura 5. Tratamientos de desinfección. A), B) y C).	49
Figura 6. Explantes de zarzamora variedad Tupy sembrados en medio de cultivo MS al 100% de sales.	52
Figura 7. Armado y piezas del sistema de inmersión temporal A) y B).	53
Figura 8. Diagrama del sistema de inmersión temporal BIT.	55
Figura 9. Evaluación de tres protocolos de desinfección con respecto al porcentaje de planta establecida.	59
Figura 10. Desinfección y establecimiento de Zarzamora A) y B)	60
Figura 11. Sistema de inmersión temporal BIT funcional para investigación.	61
Figura 12. Evaluación de sobrevivencia (A), necrosis y muerte (B), e hiperhidricidad (C) en explantes de diferentes tratamientos de frecuencias de inmersión temporal.	62
Figura 13. Sistemas de inmersión temporal para la evaluación de explantes en diferentes tratamientos de inmersión temporal, en cuanto a la sobrevivencia a diferentes frecuencias de inmersión.	64
Figuras 14. Evaluación del incremento en la longitud de explantes a diferentes concentraciones de sales MS en un sistema de inmersión temporal.	66
Figura 15. Evaluación inicial y final del efecto de la citoquinina BAP.	68
Figuras 16. Evaluación del incremento en la longitud de explantes a diferentes concentraciones de BAP en un sistema de inmersión temporal con medio MS al 100% de sale y 2 mL·L <sup>-1</sup> PPM.	68
Figura 17. Evaluación del incremento promedio en la cantidad de nudos en explantes, a diferentes concentraciones de BAP en un sistema de inmersión temporal con medio MS al 100% de sale y 2 mL·L <sup>-1</sup> PPM.	69

Figura 18. Evaluación del incremento promedio en la cantidad de hojas en explantes, a diferentes concentraciones de BAP en un sistema de inmersión temporal con medio MS al 100% de sale y 2 mL·L <sup>-1</sup> PPM.	70
Figura 19. Evaluación del incremento promedio en la cantidad de brotes en explantes, a diferentes concentraciones de BAP en un sistema de inmersión temporal con medio MS al 100% de sale y 2 mL·L <sup>-1</sup> PPM.	71
Figura 20. Desarrollo de callo embriogénico en el sistema 3.	72
Figura 21. Evaluación comparativa entre medio semisólido y un sistema de inmersión temporal en el incremento promedio de longitud en cm.	73
Figura 22. Evaluación comparativa entre medio semisólido y un sistema de inmersión temporal en el incremento promedio de nudos, hojas y brotes.	74

## Índice de Cuadros

Página

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de Zarzamora ( <i>Rubus sp.</i> ). (USDA, 2021)	22
Cuadro 2. Formulaciones de medios de cultivo a lo largo de la historia. Modificado de Soria Durand (A, B, C y D)	87
Cuadro 3. Frecuencias y tiempos de inmersión.	56
Cuadro 4. Efecto de la citoquinina BAP en la organogénesis de los explantes de Zarzamora.	71

## Resumen

La demanda de planta de zarzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*) variedad “Tupy”, ha ido en aumento a lo largo de los últimos años, sobre todo en el estado de Michoacán; sin embargo, las técnicas para su propagación *in vitro*, con las cuales se genera planta libre de patógenos, presentan ciertas limitaciones en cuanto a los rendimientos. Este estudio buscó establecer un protocolo para micropropagación de zarzamora variedad “Tupy”, mediante un sistema de inmersión temporal, técnica que ha demostrado aumentar la producción en otros cultivos. El trabajo experimental constó de seis etapas, 1) prueba de tres tratamientos de desinfección para el establecimiento *in vitro* de zarzamora, 2) prueba de diferentes frecuencias de inmersión, 3) evaluación cualitativa de un bactericida comercial (PPM), 4) evaluación de dos porcentaje de sales MS (75 y 100 %) para el medio de cultivo, 5) efecto de cuatro concentraciones de BAP (6-benzilaminopurina), (0, 1, 2, y 3 mg·L<sup>-1</sup> de medio de cultivo) sobre la longitud de explantes, número de hojas, brotes y nudos, y 6) comparación del medio semisólido y el sistemas de inmersión temporal, en cuanto a la producción y desarrollo de explantes. Los resultados muestran que el mejor tratamiento de desinfección para el establecimiento es el que presenta lavados con bactericida y fungicida, con un 91.4% de planta no contaminada, a una concentración de 2 mL·L<sup>-1</sup> de ppm, con la que se lograron hasta 15 semanas sin microorganismos en el medio de cultivo mientras que, en el caso del número de inmersiones, seis inmersiones al día, de 5 minutos cada una, fue la que presentó la mayor supervivencia, con un 90%. No hubo diferencias en cuanto a la concentración de sales MS, mientras que la concentración de 1 mg·L<sup>-1</sup> de BAP fue la mejor, ya que presentó una buena producción de brotes 16, con respecto al testigo, que solo tuvo 1. Finalmente, se demostró que el sistema de inmersión es más eficiente en cuanto a la producción de brotes con 18 brotes comparado con el medio semisólido que solo presentó 3, ambos a una concentración de 1 mg·L<sup>-1</sup> de BAP. En este estudio se pudo establecer un sistema de reproducción *in vitro* de zarzamora utilizando un sistema de inmersión, que puede ser utilizado de manera exitosa en la reproducción eficiente para la generación de planta de calidad.

**Palabras clave:** Zarzamora, micropropagación, sistema de inmersión temporal



## Abstract

The demand for blackberry plants (*Rubus* subgenus *Eubatus*) variety "Tupy", has been increasing in recent years, especially in the state of Michoacán; however, the techniques for its *in vitro* propagation, with which pathogen-free plants are generated, have certain limitations in terms of yields. This study seeks to establish a protocol for micropropagation of blackberry variety "Tupy" through a temporary immersion system, a technique that has been shown to increase production in other crops. The experimental work consisted of six stages: 1) test of three disinfection treatments for the *in vitro* establishment of blackberry, 2) test of different immersion frequencies, 3) qualitative evaluation of a commercial bactericide (PPM), 4) evaluation of two percentages of MS salts (75 and 100 %) for the culture medium, 5) effect of four concentrations of four different types of MS salts for the culture medium, 5) effect of four, (0, 1, 2, y 3 mg·L<sup>-1</sup> of culture medium) concentrations of BAP (6-benzyl amino purine) on explant length, the number of leaves, shoots, and nodes, and 6) comparison of semi-solid medium and temporary immersion systems on explant production and development. The results show that the best disinfection treatment for establishment is the one that presents washes with bactericide and fungicide, with 91.4% of the plant not contaminated, at a concentration of 2 mL·L<sup>-1</sup> of ppm, with which up to 15 weeks were achieved without microorganisms in the culture medium while, in the case of the number of immersions, six immersions per day, of 5 minutes each, was the one that presented the highest survival, with 90%. There were no differences in terms of MS salt concentration, while the concentration of 1 mg L<sup>-1</sup> of BAP was the best, since it presented a production of 16 shoots per explant, in comparison with the control, which only had 1 shoot. Finally, it was demonstrated that the immersion system is more efficient in terms of shoot production with 18 shoots, compared to the semi-solid medium that only presented 3, both at a concentration of 1 mg·L<sup>-1</sup> of BAP. In this study, it was possible to establish an *in vitro* blackberry propagation system using an immersion system, which can be successfully used in efficient propagation for the generation of quality plants.

**Key words:** Blackberry, micropropagation, temporary immersion system.

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de herramientas que lleven a cabo la micropropagación de plantas de diversas especies, actualmente es una necesidad, sobre todo aquellas que tienen una gran importancia comercial, como lo es la zarzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*), planta perteneciente a la familia de las rosáceas adaptada a climas templados, que presenta un gran interés para la industria, debido a la versatilidad que tiene, para la elaboración de diferentes productos y, sobre todo, por sus propiedades antioxidantes. Por lo que resulta ser un cultivo que necesita masificar su producción, lo cual puede lograrse a través de la micropropagación *in vitro*.

Hoy en día se conoce que la planta de zarzamora se ha llevado al cultivo de tejido *in vitro* mediante técnicas de micropropagación tradicionales, que ayudan a la obtención de plantas libres de enfermedades, en un tiempo más corto y con un mayor número de plantas, además de que lo hacen en un espacio reducido. Sin embargo, estas técnicas tienen sus deficiencias, como lo son, los altos costos de mano de obra y reactivos, por el uso de gelificantes, ya que generalmente esta técnica se trabaja con medios de cultivo semisólidos, además de que expone frecuentemente los explantes a una posible contaminación, debido a la manipulación que se tiene al momento de realizar los subcultivos.

A raíz de esto se empezaron a implementar técnicas complementarias a la micropropagación a través del cultivo de tejido *in vitro*, los sistemas de inmersión temporal, los cuales permiten disminuir los problemas que suelen presentarse en el cultivo *in vitro* tradicional, ya que, se ha comprobado la eficiencia de estos sistemas, al incrementar la producción de brotes, reducir la tasa de contaminación, e incluso en algunos cultivos, se ha encontrado que mejora el proceso de aclimatación, al disminuir la tasa de mortalidad, ya que dentro del sistema de inmersión temporal, constantemente se está recirculando el aire, lo cual ayuda a que la planta realice su intercambio gaseoso, y en la fase de aclimatación sea más fácil su adaptación, sin dejar de lado la homogeneidad de las plantas e inocuidad. Por lo anterior el uso de un sistema de inmersión temporal puede ser benéfico en la micropropagación de zarzamora.

Actualmente la zarzamora tiene una gran importancia comercial a nivel mundial, gracias a su versatilidad en la industria alimentaria, plantea Ricárdez *et al.* (2016), sin embargo las técnicas que se han utilizado convencionalmente para la producción de plantas, tal

como lo es la reproducción asexual por acodos o estacas, presentan ciertas dificultades sobre todo en el aspecto fitosanitario, debido a que este tipo de técnica favorece la transmisión de plagas y enfermedades (Sigarroa y García, 2011).

A partir de esto se han implementado técnicas que superen estas limitaciones, tal es el caso de la micropropagación *in vitro*, método por el cual se obtienen plantas libres de enfermedades de acuerdo con Sigarroa y García (2011), no obstante esta técnica también presenta ciertos obstáculos, sobre todo al momento de escalar la producción, ya que suele ser costosa, con bajos niveles de producción, además de que se pierde una gran parte de la biomasa por la manipulación de los operadores, menciona Aguirre *et al.* (2016), así como también se presenta una disminución en la variabilidad genética, lo que se traduce a una poca adaptabilidad de las plantas a factores externos (FIA, 2009).

Aunado a las dificultades que presentan las técnicas de micropropagación *in vitro* convencionales, es que se han empezado a utilizar herramientas complementarias, como los sistemas de inmersión temporal que ayuden a mitigar estas limitaciones, ya que estos permiten incrementar considerablemente el número de brotes por explante, además de reducir los costos de producción, ocasionados por la mano de obra y el uso de gelificantes, los cuales encarecen el proceso, esto sin dejar de lado que por medio de estos sistemas también es posible obtener plantas libres de enfermedades (Bello *et al.*, 2018; Lugo *et al.*, 2017).

Se conoce la utilización de esta herramienta en la micropropagación de varias especies, entre ellas la zarzamora, en la fase de enraizamiento para su posterior aclimatación, así como también en la fase de micropropagación, sin embargo, se desconoce su implementación y construcción específica para la variedad Tupy cultivada ampliamente en la región de Los Reyes Michoacán.

La zarzamora es una especie de alto valor en campo por su elevada rentabilidad y generación de empleos, así como para la industria, gracias a su alta versatilidad de consumo, ya sea en fresco, o a través de productos generados a partir de ella, como lo son jugos, pulpas, extractos, jaleas, entre otros. Además, Michoacán es uno de los principales productores, y número uno de la variedad libre Tupy, por lo que la producción de planta de manera masiva puede ser una alternativa eficiente. Sin embargo, la propagación por métodos convencionales es poco competente y promueve la transmisión de enfermedades, por otro lado, el utilizar métodos de micropropagación *in*

*in vitro* tradicionales podría aumentar la productividad, pero a pesar de ello, existir poca variabilidad genética y complicaciones para automatizar el proceso, además la manipulación que se le da a la planta bajo esta técnica puede provocar pérdidas de planta por contaminación.

Este problema podría resolverse con la implementación de un sistema de inmersión temporal, para la propagación masiva y eficiente de zarzamora, ya que se conocen algunas ventajas de utilizar los sistemas de inmersión temporal, que residen principalmente en su operatividad, la cual permite la no exposición continua de los explantes con el exterior, al no necesitar el cambio de medio, esto ayuda a disminuir las tasas de contaminación en los explantes (FIA, 2009). Otro de los beneficios que provee este método, es el de mantener toda la estructura del explante en contacto con el medio líquido, con lo cual se logra incrementar las tasas de crecimiento, y al ser intermitente la exposición del material vegetativo al medio, no permite que la planta llegue a un nivel de estrés por el contacto (García *et al.*, 2020).

Este trabajo aportará un protocolo de micropropagación para la producción eficiente de plántulas de zarzamora variedad Tupy, el cual podría ser aplicado para la generación de plantas, así como la implementación de un sistema de inmersión temporal, además el desarrollo de este trabajo podría contribuir como un aporte al conocimiento, dentro de la comunidad científica.

## **Hipótesis**

El desarrollo de un protocolo para la micropropagación de zarzamora variedad Tupy a través de un sistema de inmersión temporal puede ser eficiente para la producción de brotes.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Establecer un protocolo para micropropagación de zarzamora variedad Tupy mediante un sistema de inmersión temporal.

### **Objetivos Específicos**

- Establecer un sistema de inmersión temporal para la micropropagación *in vitro* de brotes de zarzamora variedad Tupy.
- Determinar tiempos de inmersión y concentraciones de reguladores de crecimiento en brotes de zarzamora variedad Tupy mediante el sistema de inmersión temporal.

## I. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Planta de Zarzamora

La zarzamora (*Rubus spp*) es una especie de arbusto con espinas perteneciente a la familia de las rosáceas, originaria de Norte América, Europa y Asia, por lo que se considera un cultivo de clima frío. Sin embargo, existen algunas variedades producidas a partir de la cruce de dos especies o variedades (conocidas como híbridas), de las cuales, algunas se adaptaron satisfactoriamente a climas templados y cálidos, como los que posee México (Ricárdez *et al.*, 2016; Flórez, 2016).

Los frutos de zarzamora han sido recolectados desde unos 2000 años atrás, y estos han tenido varios usos a lo largo del tiempo; en Europa cerca durante el siglo XVI, las plantas fueron utilizadas como cercas, además de con un propósito medicinal, cabe resaltar que estas fueron domesticadas hasta el siglo XVII. Derivado de la deforestación, años más tarde la zarzamora nativa comenzó a esparcirse a otras áreas geográficas, así como a hibridarse, por lo que comenzaron a cultivarse en América entre los años 1850 y 1860, ya para el año 1867 lograron registrarse 18 cultivares (Galleta y Violette, 1989).

La zarzamora es un cultivo perenne que se integra en el grupo de las “berries” o frutillas. En México, el cultivo inició de manera comercial hace más de 30 años con la variedad brazos, en la actualidad la variedad libre más utilizada es la variedad Tupy (*Rubus* subgénero *Eubatus*) (López, 2009). El cultivo de zarzamora se ha ido en aumento a lo largo del tiempo, desde unas pocas hectáreas en los años 80, diez años después ya se tenían mas de 900 hectáreas, ya en el año 2017 se registró una superficie total de 12,816 ha, mientras que en el 2018 se reportaron 13,8317 ha sembradas, sin embargo, en el 2020 se tuvo una caída a 9,781 (Figura 1) (SIAP, 2020). El estado de Michoacán es el principal productor desde entonces, y con más del 80% de la producción anual de frutilla, se encuentra el municipio de Los Reyes de Salgado, el cual genera más de 260 mil toneladas por año (Contreras *et al.*, 2019).

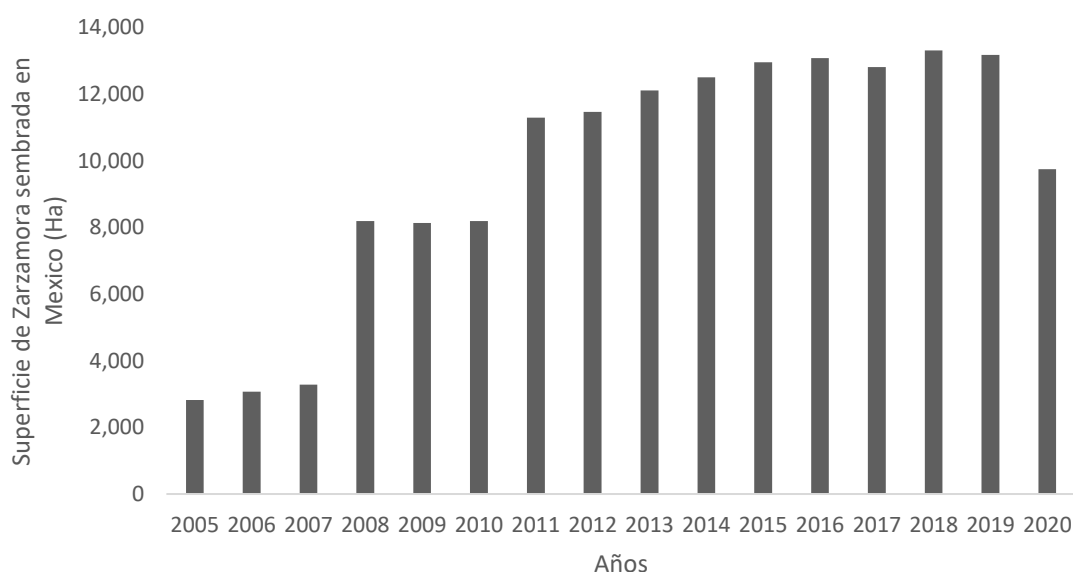


Figura 1. Hectáreas sembradas de zarzamora en México en los últimos quince años (SIAP 2020).

### ***1.1.1 Importancia de la Zarzamora como cultivo***

En los últimos años, países de América del Norte han incrementado de manera impresionante la superficie cultivada de zarzamora, debido a la fuerte demanda que se tiene de los frutos. En México el cultivo de zarzamora ha cobrado gran fuerza, sobre todo en el estado de Michoacán, donde su producción se lleva a cabo a través de tecnologías de producción forzada (Muñoz y Juárez, 1997; Calderón, 2006; López, 2009). La zarzamora ha tenido un impresionante aumento de la superficie cultivada, gracias a las diversas formas en las que se puede comercializar, no solo a nivel nacional sino también en el extranjero, por lo que tiene una alta rentabilidad, además de ayudar a la economía del país otorgando empleo a más de 900 trabajadores por cada hectárea del cultivo (Aneberries 2016).

México participa activamente en la producción de frutillas manifestó SEDRUA (2017) al destacar con un cuarto lugar a nivel mundial, con más de 25 mil hectáreas cultivadas, de las cuales, Michoacán tiene el primer lugar en producción de zarzamora a nivel nacional con 116 166 toneladas reportadas en 2016.

Como cultivo la zarzamora presenta gran importancia a nivel mundial, la cual radica principalmente en la versatilidad que tiene para su comercialización, ya sea en fresco,

congelada, a manera de extracto, pulpa o jugo, por su sabor y propiedades antioxidantes (Ricárdez *et al.*, 2016).

México realiza exportaciones de zarzamora y otras frutillas en los meses de octubre a abril, e incluso algunos productores se alargan hasta mayo, lo cual ayuda económicamente al país ya que, al existir poca oferta en ese último mes, los precios en el mercado mundial se elevan. Los agricultores mexicanos obtienen atractivas gracias a la comercialización de la fruta en fresco de hasta un 300%, incluso más que exportándolo de manera congelada a los mercados de Norteamérica, la Unión europea y Japón, países que demandan los frutos frescos por su amplia versatilidad (Calderón-Zavala, 2006).

La zarzamora no solo se destaca por su amplia diversidad de consumo, sino también por las propiedades nutricionales que posee, esta se encuentra compuesta por un 80% de jugo, en el cual se conforma por azúcares y ácidos orgánicos, como el cítrico, málico, oxálico, succínico y salicílico, además de tener vitaminas de tipo A, C y E. Por otro lado, la zarzamora en su contenido nutricional cuenta con minerales como el calcio, potasio, manganeso y hierro, además de poseer pigmentos como las antocianinas y los carotenoides que llegan a conferir color y sabor a los frutos, así como una acción antioxidante, mientras que otros ácidos como el clogénico, ferúlico, ursólico y málico, están asociados a la prevención del cáncer, ya que se consideran anticancerígenos (Rieger, 2006).

### ***1.1.2 Descripción botánica de la Zarzamora***

La zarzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*) es un arbusto de aspecto leñoso con ramas delgadas y flexibles, las cuales también presentan espinas, una sección pentagonal y pueden llegar a crecer hasta tres metros. Es una planta conocida principalmente por los frutos que produce, conocidos como zarzamoras o moras y pertenece a la familia de las rosáceas (Monasterio, 1992).

Presenta hojas con 5 foliolos, digitadas, con forma trasovada, de base redondeada, con una punta corta y bien diferenciada, tiene un haz grabo, aunque a veces peloso, y cuenta con un borde dentado, mantiene un color verde oscuro en el haz mientras que en el envés un blanco tomentoso (Monasterio, 1992).



La inflorescencia que presenta la planta de zarzamora es piramidal, falta de hojas por debajo del ápice, regularmente con una sola hoja bracteriforme, y el resto simples trifoliadas y pentafoliadas, además presenta sépalos gris-blanco tomentosos y pétalos de color rosa, rojo o blanco con menor frecuencia, y estos mantienen una forma oval, su floración ocurre en los meses de junio, julio y agosto (Monasterio, 1992).

Los frutos del género *Rubus*, llamadas zarzamoras, están compuestas por drupas arracimadas que no se separan del receptáculo y forman un conjunto carnosos, son de color rojo y se transforman en negro al madurar (Boyzo, 2014).

### 1.1.3 Clasificación taxonómica de la Zarzamora

La zarzamora es una planta perteneciente al género *Rubus*, la cual, por su tipo de reproducción asexual, en que las semillas se producen sin la fusión de gametos, y por la hibridación, presentan una gran variabilidad de especies (Rueda, 2017).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de Zarzamora (*Rubus sp.*) (Rueda, 2017).

<b>Dominio</b>	<b>Eukaryota</b>
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Superphylum</b>	Tracheophyta
<b>Phylum</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida (= Dicotyledoneae)
<b>Orden</b>	Rosales
<b>Familia</b>	Rosaceae
<b>Subfamilia</b>	Rosoidae
<b>Género</b>	<i>Rubus</i>
<b>Subgénero</b>	<i>Eubatus</i>

### 1.1.4 Propagación de la zarzamora

La zarzamora es una planta que puede reproducirse de manera sexual y asexual, cabe mencionar que esta última es la más utilizada. En el caso de la reproducción sexual, esta se realiza por medio de semillas, aunque es una técnica que se utiliza poco, ya que hay una baja tasa de germinación, además de un lento desarrollo en la planta y una mayor variabilidad (Orozco *et al.*, 2011).

Por otro lado, están las técnicas de propagación asexual, a nivel macro, como lo son por acodos y esquejes o estacas, las cuales son muy utilizadas en campo para poder reproducir las plantas, sin embargo, estos procedimientos presentan algunas limitantes, como por ejemplo la poca disponibilidad del material vegetativo, y problemas fitosanitarios que se pueden llegar a tener con esta técnica (Orozco *et al.*, 2011).

Finalmente se encuentra la propagación asexual a nivel micro, realizada a través del cultivo de tejido vegetal *in vitro*, técnica que asegura una buena calidad genética y fitosanitaria en la planta, además de que se puede obtener una gran cantidad de plantas, las cuales se obtienen a partir de yemas vegetativas o meristemas, sin embargo, las plantas producidas bajo estas condiciones presentan algunas características de anatomía, morfología y fisiología anormales, comparadas con las producidas en campo, por lo que es necesario llevarlas a un proceso de aclimatación, previo a someterlas a condiciones de invernadero o de campo, y de esta manera la planta corrige estas anomalías, y se adapta a las condiciones *ex vitro* (Orozco *et al.*, 2011).

## **1.2 Fundamentos del cultivo de tejido in vitro**

El cultivo de tejido *in vitro* fue planteado como una forma de cultivar plantas, en la que se utilizan frascos, que por lo general son de vidrio, y en los que se mantiene a las plantas bajo condiciones controladas, las cuales influyen en su crecimiento y asepsia, con lo que se logra reproducir un ambiente artificial en el que las plantas pueden desarrollarse favorablemente desde un laboratorio, para finalmente obtener cultivos libres de enfermedades (Cedrés *et al.*, 2015).

Cedrés *et al.* (2015), mencionan que el cultivo de tejido *in vitro* estaba basado principalmente en la teoría de la totipotencialidad de las células, la cual describe que, a partir de una célula vegetal se puede obtener una planta completa, sin embargo, esta célula inicial debe someterse a un proceso de desdiferenciación, es decir que esta pierda características de especialización, y posteriormente inducir a las células nuevamente a diferenciarse, en distintos caracteres morfogénicos como callos, brotes, o raíz. Para promover y controlar estos procesos es indispensable el uso de reguladores de crecimiento, los cuales estimulan la elongación y división celular (Cedrés *et al.*, 2015).

### **1.3 Importancia del cultivo de tejido *in vitro* y sus limitaciones**

En estos últimos años se argumentó que el cultivo de tejido *in vitro* ha ganado gran importancia tanto para la investigación, como para la biotecnología aplicada, destacándose en el estudio, propagación y conservación de diferentes especies vegetales (Cedrés *et al.*, 2015).

Esta técnica de cultivo de tejido *in vitro* presenta ciertas ventajas con respecto a los procesos convencionales, entre las que se encuentra, una mayor sanidad vegetal, posibilidad de reproducción rápida y homogénea de las variedades, incluso cuando son pocos los individuos iniciales, uso de un espacio reducido para una producción masiva. Aunque también presenta ciertas desventajas, que inician con la poca variabilidad genética de las plantas, lo cual se traduce a una reducida adaptabilidad de estas, así mismo el cultivo de tejido *in vitro*, requiere de mano de obra especializada, lo cual encarece el proceso, además presentan poca automatización de la técnica y un alto costo en los reactivos utilizados (Aguirre *et al.*, 2016).

### **1.4 Tipos de regeneración de plantas en cultivo de tejido *in vitro***

La regeneración es la capacidad que tienen los organismos vivos, de restaurar un tejido, u órgano, tras la pérdida o daño de este, en el caso de las plantas, estas pueden a partir de células diferenciadas, dar lugar a una nueva planta, bajo condiciones *in vitro*, en donde se tiene un control ambiental específico. Las células responden a esas señales y pueden comenzar un proceso de dediferenciación, en el cual la célula madura pierde algunas características, para regresar a un estado más primitivo y aprovechar la capacidad de dividirse, para posteriormente ser llevada por una nueva vía de desarrollo (Gamarra, 2014; Rueda, 2019).

Gracias a la regeneración de plantas, en cultivo *in vitro* o *ex vitro*, es que se puede realizar la propagación de estas, ya sea de manera clonal o vegetativa, así como también su conservación, sin embargo, hoy en día la regeneración de plantas también contribuye al desarrollo de programas para el mejoramiento genético, ya que se pueden obtener plantas completas y genéticamente uniformes (Gamarra, 2014).

La técnica de cultivo de tejido *in vitro* puede ser realizada dependiendo de la tecnología y medios de cultivo disponibles, mediante la multiplicación de brotes a partir de yemas axilares o apicales, así como también a través de brotes que no se desarrollan de manera

normal en las plantas, sino que son provocados por una poda o por el estrés de la planta, mejor conocidos como adventicios, y finalmente por embriones somáticos adventicios (Contreras, 2016).

Los tipos de cultivo de tejido dependen directamente del tipo de regeneración que ocurre en la planta, la cual se sabe, es llevada a cabo gracias a la capacidad que presenta cualquier célula vegetal de formar plantas completas, esto lo hacen por medio de organogénesis o embriogénesis somática (Rueda, 2019).

#### ***1.4.1 Organogénesis***

Es un proceso en el que ocurre la diferenciación de meristemos, a partir de células o tejidos cultivados, de acuerdo con Gisbert (2010), puede clasificarse en directa e indirecta, esta última tiene lugar, cuando ocurre la formación de brotes tras una formación intermedia de callo, mientras que, en la directa no hay una fase intermedia, ya que ocurre la propagación a partir del explante (Martín *et al.*, 2015).

La organogénesis indirecta presenta la formación de callo, gracias a que se tienen distintos niveles de auxinas y citoquininas en el medio, mismas que tratan de llegar a un equilibrio con las fitohormonas endógenas, para de esta manera propiciar la formación de órganos, sin embargo este tipo de regeneración, no asegura la fidelidad del genotipo, por lo que, esta técnica es más aplicable a sistemas con variantes somaclonales, debido a la variabilidad genética que existe, ya sea por cambios heredables en el ADN, o mutaciones con el fin de obtener mejoras en los caracteres de la planta (Gamarra, 2014).

En el caso de la organogénesis directa, como se mencionó anteriormente no se presenta una formación de callo intermedia, sino que esta comúnmente, forma brotes axilares a partir de meristemos provenientes de los nudos de la planta, sin que haya grandes modificaciones en su organización genética, por lo que, esta vía de regeneración es muy utilizada para mejorar los rangos de multiplicación, y es aplicable a técnicas de micropropagación *in vitro*, donde además de un gran volumen de plantas, se busca la producción de explantes sin variabilidad genética (Gamarra, 2014).

Para inducir un proceso de organogénesis en los distintos tipos de explantes, normalmente se realiza una combinación de reguladores de crecimiento, como lo son las auxinas y las citoquininas, las cuales deben encontrarse en concentraciones adecuadas, que habitualmente se determinan empíricamente (Gisbert, 2010).

### ***1.4.2 Embriogénesis somática***

En este tipo de regeneración, se producen embriones a partir de células somáticas, los cuales presentan las mismas fases de desarrollo que un embrión cigótico, pero sin ser el resultado de la fecundación de gametos, este proceso morfogénico tiene lugar mediante dos vías, la directa y la indirecta, las cuales se diferencian por las fases que presentan, por ejemplo, en el caso de la indirecta ocurre una fase intermedia, conocida como formación de callo, de la cual posteriormente puede ocurrir embriogénesis somática, a diferencia de la directa, en la cual no hay fases intermedias, únicamente se produce la embriogénesis a partir del tejido utilizado (Gisbert, 2010).

Este método de regeneración es considerado teóricamente como el más eficiente, en cuanto a producción, debido a su capacidad de formar raíces o brotes, sin embargo, es una técnica un tanto limitada, debido al desconocimiento que existe todavía de algunos parámetros que regulan el proceso, así como también son pocas las especies en las que se ha comprobado su eficiencia (Freire, 2003).

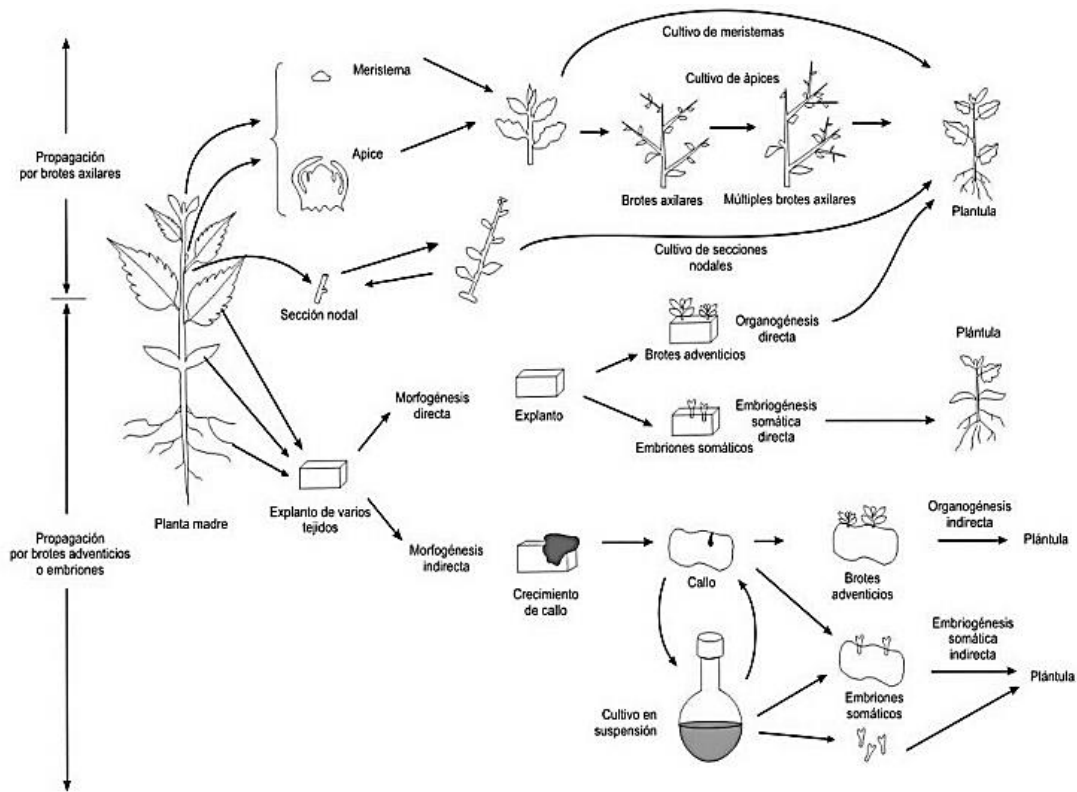


Figura 2. Tipos de regeneración de plantas en cultivo de tejido *in vitro*, modificado de Contreras, (2016).

## 1.5 Etapas del cultivo *in vitro*

Para lograr la micropropagación de cualquier cultivo es necesario llevar a cabo cinco etapas, las cuales son muy importantes para asegurar la eficiencia del sistema de micropropagación por cultivo *in vitro* (Contreras, 2016).

### 1.5.1 Selección de la planta madre y recolección de los explantes

Esta etapa denominada como “cero”, es de vital importancia, ya que a partir de esta, se obtienen las plantas con las que se inicia el proceso, las cuales deben tener como requisito las características propias de la especie o de la variedad con la que se va a trabajar, además las plantas a elegir, se deben encontrar libres de enfermedades, en ocasiones se realizan pruebas para detectar si la planta presenta alguna enfermedad sistémica, y en caso de que si, se elige una planta que no la presente, o se aplican tratamientos fungicidas y bactericidas, para eliminar o reducir la causa de la enfermedad, esto a su vez reduce la probabilidad de contaminación en el sistema *in vitro* (Contreras, 2016).

Es importante tomar en cuenta la edad de la planta madre, así como también la etapa fenológica en la que se encuentra, sobre todo esta última, ya que tiene gran influencia en el comportamiento posterior de los cultivos, por lo que lo ideal es realizar la recolección de los explantes durante la fase activa de crecimiento de las plantas, y sobre todo en los brotes más jóvenes, debido a que presentan una mayor capacidad regenerativa o totipotente (Villarroel y Cadima, 2016).

Es importante la época del año en la recolección de los explantes, debido a las pruebas que se han hecho en diferentes estaciones del año a los cultivos, ya que se ha observado que, en primavera las plantas presentan una mayor actividad en el desarrollo de órganos, a consecuencia de una presencia más alta de fitohormonas, como auxinas, giberelinas y citocininas, que posteriormente en el otoño comienzan a ir en declive (Villarroel y Cadima, 2016).

### ***1.5.2 Fase de establecimiento en cultivo de tejido in vitro***

La finalidad de esa fase es la obtención de un cultivo aséptico, es decir libre de contaminantes visibles, así como también una planta totalmente adaptada a condiciones *in vitro*, de modo que esta pueda reaccionar favorablemente a la administración de biorreguladores en la etapa de multiplicación (Villarroel y Cadima, 2016). Es importante también, tomar en cuenta el tamaño del explante debido a que, a mayor tamaño, este presenta un equilibrio interno más determinante, por lo que el medio de cultivo tendrá solo una influencia limitada, mientras que cuando es más pequeño, el medio de cultivo puede orientarlo de mejor manera (Villarroel y Cadima, 2016).

La asepsia de los explantes se logra por medio de la desinfección de estos, pero sin provocarle daños severos o la muerte al material vegetativo, por lo que generalmente se utilizan productos derivados del cloro, como el hipoclorito de sodio o el de calcio, además se suelen agregar algunas gotas de detergente, que ayuden a retirar las ceras encontradas en la cutícula de las plantas, para que de esta manera el explante pueda tener un mayor contacto con el agente desinfectante, uno de los detergentes más comunes es Tween 20 a una concentración de 0.01 a 0.05% (v/v), sin embargo, pueden utilizarse de igual manera los de cocina (Villarroel y Cadima, 2016).

Otro elemento muy utilizado en la desinfección de explantes es el etanol, en concentraciones que van del 70% al 80%, esto debido a que en concentraciones mayores

pierde efectividad y podría llegar a deshidratar los tejidos del explante, también es necesaria la aplicación de lavados con agua destilada estéril para eliminar los residuos de los desinfectantes, todo esto realizado bajo campana de flujo laminar (Villarroel y Cadima, 2016).

El aislamiento de los explantes es otro proceso que hace parte del establecimiento, el cual consiste en pasar a medio de cultivo los explantes ya desinfectados, este proceso debe llevarse a cabo de manera rápida, ya que debe evitarse a toda costa la deshidratación de los tejidos del explante, así como una contaminación por una mala manipulación, ya que prácticamente de esto dependerá la supervivencia y desarrollo de los explantes (Villarroel y Cadima, 2016). Para llevar a cabo el aislamiento, es necesario el uso de medios de cultivo, los cuales presentan un balance de sales y vitaminas adecuado, además pueden incluir en su formulación, bajas cantidades de reguladores de crecimiento para promover la elongación celular, aunque se debe tener estricto cuidado con la adición de estos durante el establecimiento, ya que pueden propiciar repuestas indeseables en la planta, como la formación de callo o una intoxicación de los tejidos (Ugarte *et al.*, 2016).

Durante el establecimiento, la planta trata de adaptarse a las condiciones *in vitro*, por lo que se regulan algunos factores como luz y temperatura, estos factores pueden variar mucho, sin embargo al iniciarse la incubación, es más factible en el caso de la luz, utilizar oscuridad total o reducida, con la finalidad de minimizar la oxidación fenólica, posterior a este periodo inicial, destacó que se puede utilizar una intensidad de 2.000-2.500 lux, con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad, mientras que en el caso de la temperatura, resulta eficiente un rango de 20- 27 °C para la mayoría de las especies (Villarroel y Cadima, 2016).

### ***1.5.3 Fase de multiplicación en cultivo de tejido in vitro***

La función de esta fase es la de obtener la mayor cantidad de brotes posibles, y en general la eficiencia de un protocolo de micropropagación depende de esta etapa, argumentó Contreras (2016), esta fase comienza con la obtención de un cultivo de partes aéreas o yemas libres de contaminación, lo suficientemente establecidas como para asimilar de mejor manera los biorreguladores de crecimiento, en esta etapa no solo es necesario tener altas tasas de multiplicación, si no también guardar ciertos aspectos de



calidad como lo es la homogeneidad, es decir que exista la mínima variación de un explante a otro (Villarroel y Cadima, 2016).

Dentro de la fase de multiplicación, hay aspectos controlables que pueden ayudar a optimizar la propagación de explantes nuevos a partir de uno inicial, y estos son: la composición del medio de cultivo, las condiciones durante su incubación y la manipulación del material durante los subcultivos (Villarroel y Cadima, 2016). En el caso de la composición del medio, se suele utilizar el mismo medio de cultivo que se usa en el establecimiento, el más común es el Murashige y Skoog (1962), el cual presenta una formulación a base de macronutrientes y micronutrientes, misma que puede ser adicionada con vitaminas, inositol, sacarosa como fuente de carbohidratos, entre otros compuestos orgánicos, y básicamente las variaciones en la composición de los medios dependerá estrictamente del tipo de cultivo con el que se esté trabajando (Ugarte *et al.*, 2016).

En el caso de la sacarosa se suelen utilizar valores entre el 2-4 % (p/v), debido a que por debajo de esta concentración los explantes pueden presentar un amarillamiento de los tejidos ocasionados por la falta de clorofila, mientras que por encima de los valores pueden ocurrir problemas relacionados al potencial osmótico, el cual puede llevar a un deterioro de los explantes (Ugarte *et al.*, 2016).

La manipulación de vitaminas y micronutrientes no es de gran relevancia en la fase de multiplicación, mientras que los biorreguladores de crecimiento, son indispensables durante esta etapa, ya que estos permiten terminar con la dominancia apical, la cual da lugar a la promoción de yemas axilares, comúnmente se utiliza un balance de auxinas y citocininas, que de preferencia deben encontrarse en menor proporción las auxinas, las cuales ayudan a eliminar el efecto inhibitorio a la elongación celular provocado por la citocinina, ya que de ser muy alto, pudiera favorecer demasiado el enraizamiento y la formación de callo (Ugarte *et al.*, 2016).

En cuanto a las condiciones de incubación en los explantes durante esta fase de multiplicación, permanecen iguales a la fase de establecimiento, con un fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad, bajo una intensidad de 2.000-2.500 lux, y a una temperatura que oscila entre los 20 y los 26 °C (Villarroel y Cadima, 2016).

Otro de los aspectos que influye bastante en la etapa de multiplicación, es la manipulación de los explantes durante el proceso de repicaje, por lo que se deben considerar algunos factores, como el tamaño de explante, o la frecuencia con la que se realizan los subcultivos, ya que la planta pasa por tres fases durante este proceso, inicialmente la planta sufre una etapa de estrés por el cambio de medio, el corte y la exposición al flujo laminar de la campana, por lo que necesita recuperarse, y mientras lo hace no presenta multiplicación y crecimiento, después en una segunda etapa, la planta ya adaptada al medio, presenta un crecimiento y multiplicación exponencial, para finalmente en una tercera fase, manifestar senescencia por el agotamiento de los nutrientes, la falta de agua en el medio cultivo y la acumulación de gases como el etileno (Villarroel y Cadima, 2016).

La duración de los tres periodos posteriores al repicaje mencionados en el párrafo anterior, varía mucho de una especie a otra, normalmente las tres fases duran aproximadamente cuatro semanas, sin embargo, las especies leñosas pueden durar hasta seis o más semanas, debido a que estas tardan más tiempo en recuperarse del repicaje (Villarroel y Cadima, 2016). El tipo de explante también es un factor que influye en la multiplicación, ya que algunas secciones de este presentan mayor capacidad de multiplicación, un ejemplo de esto son los ápices, los cuales presentan una mayor facultad de propagación en comparación con las yemas laterales o secciones nodales (Villarroel y Cadima, 2016).

#### ***1.5.4 Fase de enraizamiento en cultivo de tejido in vitro***

Es una etapa en la que se busca la elongación y la formación de raíces, para favorecer su adaptación al medio externo, esta formación puede ser muy variable de una especie a otra, algunas necesitan la adición de biorreguladores, para inducir la generación de raíces y otras lo hacen solo con el medio de cultivo o tras agregar carbón activado (Contreras, 2016). Generalmente el procesos de inducir la promoción de raíces en plantas, se lleva cabo mediante la adición de auxinas al medio, ya que estas favorecen el crecimiento y elongación de las mismas, sin embargo también influye la calidad del material vegetativo con el que se inicia esta fase, el cual de preferencia debe ser juvenil, así como el tipo de explante que se tiene, ya que aquellos provenientes de plantas herbáceas son más fáciles de inducir al enraizamiento en comparación a los de plantas leñosas (Villarroel y Cadima, 2016).

En ocasiones el proceso de enraizamiento, puede verse dificultado tras la presencia de citocininas residuales en los tejidos, aun cuando es inducido por auxinas exógenas, las cuales suelen ser muy variables durante esta fase, debido a que se puede utilizar un solo tipo, o la combinación de algunas, y de igual manera la concentración de estas, suele cambiar de una especie a otra, usándose más comúnmente el ácido-indol-3-butírico, el ácido 1-naftalenacético y el ácido-indol-3-acético (Villarroel y Cadima, 2016). También se utiliza el carbón activado para la inducción de raíces, ya que este propicia o simula la oscuridad a la que las raíces están acostumbradas en un medio externo, condición por la que se desarrollan de mejor manera, además que a nivel químico ayuda a retirar algunos compuestos inhibitorios del enraizamiento, sin embargo, provoca que exista menor disponibilidad de auxina libre en el medio, por lo que es necesario adicionar más de lo normal (Villarroel y Cadima, 2016).

En cuanto a las condiciones bajo las que se debe mantener la planta en incubación, son las mismas que se han tenido a lo largo de las etapas anteriores, las cuales consisten en una temperatura que oscila entre los 20 y 27 °C, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, mientras que la intensidad de la luz se mantiene de 2.000-2.500 lux (Villarroel y Cadima, 2016).

El enraizamiento también puede llevarse a cabo *in vivo*, como una estrategia para la reducción de costos, en la cual las plantas provenientes de la fase de multiplicación con un desarrollo previo de micro esquejes, son llevados directamente a sustrato estéril, tras la aplicación de enraizadores comerciales o una solución de auxinas en la base, para promover el desarrollo de la raíz, además de mantenerse bajo una humedad relativa alta; esta técnica presenta un mayor nivel de mortalidad en las plantas que la técnica *in vitro*, sin embargo, se ahorra una etapa completa del cultivo de tejido, y presenta algunas ventajas sobre las raíces generadas *vía in vitro* y sus complicaciones, ya que estas no poseen pelos radiculares, además durante el trasplante puede dañarse la raíz por la manipulación, sobre todo al querer eliminar los residuos de medio de cultivo (Contreras, 2016).

#### ***1.5.5 Fase de Aclimatación del cultivo de tejido in vitro a condiciones ex vitro***

Esta etapa se caracteriza por la transferencia de plantas completas de un ambiente *in vitro*, a un ambiente externo de invernadero, la cual es esencial para poder obtener

nuevas plántulas de la especie de interés, por lo que este proceso debe ser llevado a cabo bajo precaución, sobre todo tratar de minimizar el estrés que la planta pueda sufrir por el trasplante, y de esta manera aumentar el nivel de supervivencia, los factores que influyen esta supervivencia son, la temperatura, la humedad relativa del aire, la luz y las condiciones en las que se encuentra el sustrato (Lencina *et al.*, 2017).

El proceso de aclimatación puede ser bastante crítico y en ocasiones una limitante para llevar a cabo con éxito la micropropagación *in vitro*, ya que la planta en condiciones *in vitro* no tiene una tasa de respiración alta, debido a la baja intensidad de luz y una elevada humedad relativa, de ahí pasa a un ambiente que le demanda una tasa de respiración mayor, por lo que la planta es más vulnerable al estrés hídrico, además las plantas bajo condiciones *in vitro* no realizan fotosíntesis, mientras que en un ambiente externo si, por lo que pasan de ser organismos heterótrofos, dependientes de los nutrientes que hay en el medio, en especial de los carbohidratos, de los cuales obtienen energía, a ser organismos autótrofos, capaces de producir su propio alimento (Villarroel y Cadima, 2016).

Por otro lado, las plantas *ex vitro* también son susceptibles al ataque de diversos microorganismos, ya que pasan de un ambiente totalmente aséptico, a uno donde se encuentran expuestas a todo tipo de patógenos, los cuales pueden proliferar más convenientemente por la alta humedad relativa del aire, misma que debe mantenerse para evitar la deshidratación de las plantas *ex vitro* (Villarroel y Cadima, 2016).

Debido a los diversos inconvenientes que puede presentar esta etapa de aclimatación, se han desarrollado técnicas específicas para la aclimatación de diferentes especies, ya que para cada una es un proceso específico, de esto y de la calidad con que venga la planta de la etapa anterior, depende la supervivencia de las mismas, mientras que los pasos básicos son: trasladar las plantas *in vitro*, que presentan un buen enraizamiento hacia el invernadero, una vez aquí, se sacan de los frascos para lavar con agua los residuos de gelificante de sus raíces, ya que estos carbohidratos son muy propensos al ataque por hongos, después se realiza una aplicación de fungicida a una muy baja concentración para desinfectarlas y poder ser trasplantadas a bandejas o camas de aclimatación con sustrato estéril, se cubre con un plástico, para mantener la humedad relativa y se mantienen así por un periodo de cuatro a seis semanas dependiendo de la especie (Villarroel y Cadima, 2016).

## **1.6 Medio de cultivo**

El medio de cultivo es uno de los factores importantes, o con mayor influencia en el éxito de un cultivo de tejido *in vitro*, ya que por medio de este, se suministran los nutrientes que favorecen el crecimiento y desarrollo de los explantes, los cuales deben ser muy similares a los que se encuentran normalmente en el suelo, la composición del medio de cultivo está hecha a partir de algunos componentes generales y otros más específicos, mismos que dependen estrictamente de la especie, y la etapa de micropropagación *in vitro* en la que se encuentren (Ugarte *et al.*, 2016; Contreras, 2016).

### ***1.6.1 Composición del medio de cultivo***

El medio de cultivo, es parte fundamental de la técnica de cultivo de tejido *in vitro*, y este funciona como sustrato, el cual aporta la energía necesaria, para un buen desarrollo del material vegetativo, además es la combinación de distintos componentes, los cuales van a variar proporcionalmente, según la variedad, el tipo de explante y el proceso morfogénico que se desea seguir (Suárez, 2020).

La composición de los medios de cultivo está basada lógicamente, en agua, y esta puede llegar a representar hasta un 95% de cualquier medio de cultivo, además se compone de sales minerales, compuestos orgánicos, e incluso pueden utilizarse complejos naturales para enriquecerlo, además se logra dar soporte si así se requiere, con el uso de agentes gelificantes (Suárez, 2020; Hurtado y Merino, 1987).

#### ***1.6.1.1 Agua en la composición del medio de cultivo***

El agua es el principal elemento que compone al medio de cultivo, debido de que esta funciona como solvente del resto de compuestos utilizados, es por eso que su calidad debe ser óptima, para no impactar de manera desfavorable al medio de cultivo, generalmente, se busca un agua de mayor pureza, comparada con el agua corriente, por lo que se suele optar por el agua destilada, desionizada o tratada bajo ósmosis inversa (Suárez, 2020).

#### ***1.6.1.2 Sales minerales en la composición del medio de cultivo***

Las sales minerales que se añaden al medio de cultivo, están constituidas por aproximadamente diecisiete elementos, que son los más comunes, de los cuales algunos son macronutrientes, y otros micronutrientes, en el caso de los macronutrientes, son

elementos que se agregan en mayor cantidad en comparación con los micronutrientes, sin embargo, ambos grupos son esenciales para el desarrollo óptimo de la planta, los elementos utilizados son los siguientes carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, azufre, boro, cloro, cobre, fierro, manganeso, molibdeno, zinc y níquel, con los cuales se han generado distintas formulaciones a lo largo de los años (Cuadro II A, II B, II C, y II D ANEXO 1), actualmente se tienen medios específicos, formulados a partir de la morfogénesis que se desea inducir, así como también de las características propias de la planta (Prieto *et al.*, 2005).

En el caso de los macronutrientes (carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre) estos juegan un papel muy importante en el crecimiento de las plantas, debido a que conservan el equilibrio iónico de estas, mientras que los micronutrientes (boro, cloro, cobre, fierro, manganeso, molibdeno, zinc y níquel) actúan principalmente en el control enzimático, ya sea como activadores o simplemente como constituyentes de las enzimas, las cuales ayudan a llevar a cabo los procesos biológicos en plantas (Ugarte *et al.*, 2016).

El medio basal Murashige y Skoog (1962), se ha demostrado que puede ser adecuado para una gran cantidad de especies y variedades, así como también para distintos segmentos de la planta señaló Hurtado y Merino (1987), inclusive a partir de la fórmula original de este medio (véase Anexo 1), se han realizado varias modificaciones, según los requerimientos del cultivo (Ugarte *et al.*, 2016).

### ***1.6.1.3 Compuestos Orgánicos en el medio de cultivo***

Los compuestos orgánicos, son aquellos formados principalmente por carbono, señaló Suárez (2020), y en el caso de los medios de cultivo, los compuestos orgánicos mayormente utilizados son los carbohidratos, las vitaminas y los biorreguladores de crecimiento, aunque en ocasiones se ha reportado el uso de aminoácidos, ácidos nucleicos (purinas y pirimidinas), e incluso ácidos orgánicos (Hurtado y Merino, 1987).

- **Carbohidratos**

Estos son utilizados como fuente de energía, ya que aunque las plantas son autótrofas, bajo un esquema de cultivo de tejido *in vitro*, presentan tasas fotosintéticas muy bajas, y es necesario adicionar una fuente de carbono, que generalmente es sacarosa, debido a que es bastante soluble en agua, y esta puede transportarse vía floema al resto de

órganos, la sacarosa puede añadirse en concentraciones que van de 2 al 5%, esto dependerá del tipo de cultivo y explante (Prieto *et al.*, 2005; Valdivia, 2009)

- **Vitaminas**

Estas son utilizadas para catalizar reacciones en diversos procesos metabólicos, es por eso que se consideran como estimulantes del crecimiento, incluso si alguna falta, esto podría ser un factor limitante en el proceso de organogénesis (Ugarte *et al.*, 2016). Dentro de Murashige y Skoog (1962) las vitaminas más esenciales son la tiamina y la piridoxina (Valdivia, 2009).

#### **1.6.1.4 Complejos naturales**

Estos compuestos se utilizan para enriquecer los medios de cultivo, como una última alternativa tras no conseguir el éxito deseado, en el cultivo de células u órganos, y aunque son poco utilizados, existen varias preparaciones de distinta composición que se han empleado, algunos ejemplos son la pulpa de plátano ( $150 \text{ g L}^{-1}$ ), endospermo de coco (10 a 20%), extracto de malta ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ), jugo de naranja (3 a 30%), hidrolizado proteico (caseína, lactoalbúmina, peptona y triptona) a una concentración de 30 a 3000  $\text{mg L}^{-1}$ , jugo de tomate (30%), y extracto de levadura (50 a 5000  $\text{mg L}^{-1}$ ), por mencionar algunos, los cuales permiten estimular el crecimiento de los cultivos (Hurtado y Merino, 1987).

#### **1.6.1.5 Agentes gelificantes**

Los agentes gelificantes, son materiales que dan soporte al medio de cultivo, ya que forman una matriz de apariencia semisólida, la cual permite realizar la siembra de los explantes (Valdivia, 2009). El agar es el medio de soporte más utilizado en el cultivo de tejido *in vitro*, ya que provee un gel húmedo excelente, que permite la absorción de nutrientes por parte de la planta, el cual se obtiene tras agregar agar en concentraciones que van desde un 0.6 hasta un 1%, dependiendo que tan sólido se necesite para cada cultivo, sin embargo, no es el único gelificante, también puede emplearse el phytigel, la carragenina que suele ser más económica, la agarosa entre otros (Ugarte *et al.*, 2016).

#### **1.6.2 Tipos de medios de cultivo**

Los medios de cultivo pueden clasificarse en semisólidos y líquidos, en el caso de los medios semisólidos, lógicamente presentan un material de soporte para dar esa

consistencia, mientras que en los medios líquidos no se utiliza ninguno de estos componentes (Ugarte *et al.*, 2016).

#### ***1.6.2.1 Medio semisólido***

En este tipo de medios el explante se mantiene fijo, gracias al material de soporte, y se conserva en contacto con el medio solo través de la base, que es por donde realiza la absorción de nutrientes, los medios semisólidos son ampliamente utilizados en la micropropagación por cultivo de tejido, sin embargo, estos presentan algunas desventajas, como una baja tasa de multiplicación, provocada por una superficie de contacto con el medio pequeña, otro de los inconvenientes al utilizar este medio, es su renovación cada cierto tiempo, ocasionada por el agotamiento de los nutrientes, tras la absorción de estos por las plantas (FIA, 2009).

#### ***1.6.2.2 Medio líquido***

El medio líquido, presenta una mayor tasa de crecimiento comparada con los medios semisólidos, esto debido a que existe una mayor superficie de contacto del explante con el medio, lo cual facilita la absorción de nutrientes, sin embargo, una exposición prolongada de los explantes con el medio, puede originar estrés en el material vegetativo, como lo es, la oxidación y en ocasiones la vitrificación o hiperhidricidad (FIA, 2009).

### **1.7 Reguladores de crecimiento**

Los reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos, capaces de simular la función de las fitohormonas, las cuales son producidas de manera espontánea y en cantidades pequeñas por las plantas, estas presentan la función de inducir o regular algunos procesos, como lo es la división y elongación celular, por medio de señales que permiten la comunicación entre células, por otro lado, los reguladores de crecimiento, también conocidos como biorreguladores, son elaborados de manera sintética en el laboratorio o producidos por otros organismos (Alcántara *et al.*, 2019).

#### ***1.7.1 Tipos de reguladores de crecimiento***

Hay diferentes tipos de reguladores de crecimiento y estos pueden organizarse en base a cómo operan en el interior de la planta; dentro de esta clasificación se encuentran los promotores, que se caracterizan por inducir procesos de crecimiento y diferenciación



celular (Alcántara *et al.*, 2019; Cossio y Marassi, 2013). Basado en el mecanismo de acción que tienen los reguladores de crecimiento en las plantas, se tiene también a los de carácter inhibitor, los cuales son capaces de impedir el desarrollo de algunos tejidos o incluso detener la producción de ciertas hormonas vegetales, y finalmente se presentan los retardantes, los cuales impiden la senescencia natural de los tejidos y estructuras, por lo que incrementan el tiempo de vida de la planta (Cossio y Marassi, 2013).

Dentro de los promotores de crecimiento comúnmente se encuentran compuestos como las auxinas, las citocininas, giberelinas, poliaminas y el etileno por mencionar algunos, y en el caso de los inhibidores de crecimiento se consideran, el ácido abscísico y el etileno, el cual en ocasiones también tiene este efecto, con lo que se puede inferir que los reguladores de crecimiento no inducen solo un proceso específico, sino que pueden tener distintos efectos, por otro lado los retardantes cuentan con el ácido salicílico, el cual es utilizado para incrementar el tiempo de vida floral (Alcántara *et al.*, 2019).

Reguladores de crecimiento más utilizados en el cultivo de tejido *in vitro*:

#### ***1.7.1.1 Auxinas***

Las auxinas son reguladores de crecimiento, que intervienen en diversos aspectos del desarrollo en las plantas, además fueron de las primeras hormonas en describirse, su nombre viene del griego "*auxein*" que significa crecer (Suárez, 2020; Valdivia, 2009).

Entre los efectos generados en plantas por auxinas, se encuentran los de crecimiento, como la elongación celular de tallos, la extensibilidad de la pared celular, y la diferenciación del sistema vascular, por otro lado, también estimula la dominancia apical, el fototropismo y gravitropismo positivo de las raíces (Suárez, 2020; Ugarte *et al.*, 2016). Las principales auxinas son el ácido indol-3-acético (IAA), el cual es producido de manera natural y después se encuentran los sintéticos como el ácido índole butírico Ugarte *et al.*, 2016).

#### ***1.7.1.2 Citoquininas***

Es un grupo pequeño de reguladores derivado de las adeninas, que deben su nombre a la función que realizan, la citoquinesis, los primeros trabajos realizados con citoquininas los hizo Folk Skoog en la universidad de Wisconsin, al tratar de encontrar un compuesto que estimulara la proliferación celular (Prieto *et al.*, 2005; Ugarte *et al.*, 2016).

Las citoquininas tienen la capacidad de estimular la síntesis de proteínas, son participantes del control del ciclo celular, por lo que éstas pueden estimular y regular la división celular, además ayudan al crecimiento de yemas laterales, tras la inhibición de la dominancia apical, y producen cambios en la morfología de la planta según el tipo de crecimiento (Contreras, 2016; Ugarte *et al.*, 2016).

Los protocolos de micropropagación toman como un componente fundamental a las citoquininas, sin embargo, deben ser utilizadas en pequeñas cantidades, ya que el efecto de hiperhidricidad se ha llegado a asociar con ellas, en el cual produce un aspecto vitrificado, provocado por un desorden a nivel fisiológico en plantas *in vitro*, el cual se caracteriza por una anormalidad estomática, hojas rígidas y una deficiente formación de cutículas (Prieto *et al.*, 2005).

Frecuentemente se utilizan la zeatina N6 (N6-4 Hidroxi, 3-metil, 2-buteril) y algunas no purínicas como el CPPU N-(2-cloro-4-piridil) o el Thidiazuron, (TDZ), los cuales pertenecen a las hormonas naturales mientras que, por parte en los reguladores de crecimiento sintéticos se encuentra, la kinetina (KIN), N6 Benzylaminopurina (BAP), N6benciladenina (BA), N6 dimetil alil aminopurina (2ip), entre otras (Suárez, 2020; Ugarte *et al.*, 2016).

### ***1.7.1.3 Giberelinas***

Las giberelinas son un grupo de reguladores de crecimiento, formadas por diterpenos, los cuales presentan tres anillos aromáticos, mientras que su base estructural es el isopreno, y uno de sus precursores es el ácido mevalónico, las giberelinas son de muchas formas, por lo que se dice que es un grupo heterogéneo, sin embargo, todas son ácidos (Hurtado y Merino, 1987; Prieto *et al.*, 2005; Ugarte *et al.*, 2016).

Se observa el efecto de las giberelinas a principios del siglo XX en los arrozales de Japón, tras observar que las plantas contaminadas con el hongo *Gibberella fujikuroi*, crecían más que las que no lo tenían, por su parte estas, estimulan la elongación de tallos y formación de entrenudos, además inducen a la germinación en semillas, tras hacer posible la movilización de reservas en ellas (Prieto *et al.*, 2005; Ugarte *et al.*, 2016).

A pesar de existir aproximadamente 90 compuestos similares a la giberelina, la más comúnmente utilizada es el ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), el cual promueve la elongación de tallos micropropagados, sin embargo, cabe mencionar que se ha encontrado cierto efecto

inhibitorio en la formación de tallos nuevos y raíces, por lo que no es recomendable para la fase de multiplicación de brotes, o la promoción de raíces (Suárez, 2020).

### ***1.7.2 Importancia de los reguladores de crecimiento***

Los reguladores de crecimiento son ampliamente utilizados en la agricultura, así como también dentro de cultivo de tejido vegetal, ya que estos al regular e inducir distintos procesos en plantas, pueden potenciar la formación de brotes, raíces y el alargamiento de tallos, con lo que se logra aumentar significativamente los rendimientos y la calidad de las plantas (Alcántara *et al.*, 2019).

Cabe mencionar que el uso de estos reguladores y la concentración en la que se aplican, dependen totalmente del efecto que se desea provocar en la planta, la especie que se maneja, la variedad y etapa fenológica en la que se encuentra, así como tener conocimiento de su fisiología, ya que de esta manera se pueden aplicar dosis adecuadas, sin alterar demasiado el balance de hormonas naturales (Alcántara *et al.*, 2019).

## **1.8 Sistema de inmersión temporal**

Los sistemas de inmersión temporal son plataformas controladas semiautomáticamente, con la finalidad de mantener el material vegetativo expuesto al medio de cultivo líquido, por un corto lapso de tiempo, en condiciones de total asepsia, estos sistemas nacen en el año de 1997, en el CIRAD (*Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement*) Francia, los cuales logran su cometido, gracias a la aplicación de un flujo de aire, que emana hacia el frasco que almacena el medio de cultivo y de esta manera hacerlo subir hasta llegar al recipiente con los explantes para proceder a la inmersión, la cual llega a su término una vez que el aire deja de fluir hacia el frasco con medio de cultivo, debido a que el medio sin la presión del aire, regresa a su frasco original por medio de gravedad (Rocano *et al.*, 2017; Rosales *et al.*, 2003).

Esta técnica basada en los sistemas de inmersión temporal, funciona como un complemento a la micropropagación *in vitro* convencional, ya que ha venido a revolucionar la técnica gracias al manejo que presentan, tras lograr superar ciertos obstáculos propios del método, al permitir mayores tasas de multiplicación, enraizamiento y aclimatación, con lo que se logran altos niveles de supervivencia en invernadero o campo (FIA, 2009; Rosales *et al.*, 2003).

### ***1.8.1 Fundamento de los sistemas de inmersión temporal***

Los sistemas de inmersión temporal basan su funcionamiento en la exposición de los explantes al medio de cultivo líquido, por lapsos cortos y regulares de tiempo, mediante el bombeo de aire a través de un filtro, esto permite que al término del paso de aire, los explantes drenen por gravedad el medio de cultivo, al sitio de almacenamiento, para de esta manera solo empapar los explantes y que estos logren absorber el medio por toda la superficie de contacto, lo que se refleja en una mayor tasa de multiplicación y un mejor desarrollo de los explantes (FIA, 2009; Oviedo *et al.*, 2015). Además, se sabe que los sistemas de inmersión temporal permiten un intercambio gaseoso, lo cual modifica la atmósfera interna de los biorreactores, propiciando un mayor y mejor, desarrollo de los explantes, además de evita la desecación del material vegetativo, tras dejar una ligera capa de medio de cultivo, en la superficie de las plantas (Rosales *et al.*, 2003).

### ***1.8.2 Tipos de sistemas de inmersión temporal***

Desde la invención de los sistemas de inmersión temporal, se han propuesto varias técnicas con diferentes tipos de biorreactores, para de esta manera buscar obtener mejores resultados y realizar una micropropagación del material vegetativo más sencilla, por lo que hoy en día se conoce una gran variedad de tipos de biorreactores, cada uno con diferentes resultados, ventajas y desventajas, por lo que se enlistan algunos de los más comunes (Arredondo, 2019).

#### ***1.8.2.1 Sistemas de inmersión temporal BIT (Biorreactor de Inmersión Temporal)***

El sistema de inmersión temporal BIT, también conocido como el de “frascos gemelos”, consiste precisamente en dos frascos iguales, uno que contiene el medio líquido y el otro con el material vegetativo, los cuales se encuentran interconectados, mediante una manguera de silicona, además de tener una conexión de manguera extra, por la cual se suministra un flujo de aire a presión, lo que provoca que el medio de cultivo llegue al frasco donde se encuentran las plantas, en el cual se está propiciando una aireación continua, que agita los explantes durante la inmersión, una vez que finaliza el tiempo de inmersión, tras detener la presión del aire, se crea una nueva presión proveniente del frasco de las plantas (figura 3, inciso A), que provoca el regreso del medio a su frasco original (Arredondo, 2019).

El biorreactor de inmersión temporal (BIT) al igual que otros sistemas, presenta ventajas y desventajas con respecto a su uso, en cuanto a las ventajas que se le atribuyen se encuentra, que reduce los problemas de hiperhidricidad o vitrificación, en comparación con el cultivo en medios líquido ya que permite regular los tiempos de inmersión, los cuales suelen semiautomatizarse, bajo costo, comparado con otros sistemas en los que las piezas son de importación (Arredondo, 2019; Bello *et al.*, 2017; Castillo *et al.*, 2019; Rocano *et al.*, 2017).

Dentro las desventajas más comunes que ocurren a este tipo de sistemas de inmersión temporal, es la contaminación, porque aunque el medio de cultivo puede ser cambiado, sin provocar estrés y o perjudicar la asepsia, cualquier movimiento en falso puede desencadenar en contaminación, y al estar en frascos interconectados, se puede reducir invariablemente el volumen de biomasa a causa de una contaminación, cabe mencionar que utilizar este sistema puede resultar algo complejo debido a que, para su funcionamiento requiere de la sincronización de dos válvulas de solenoides, para el movimiento del medio de cultivo (Arredondo, 2019; Bello *et al.*, 2017; Castillo *et al.*, 2019; Rocano *et al.*, 2017).

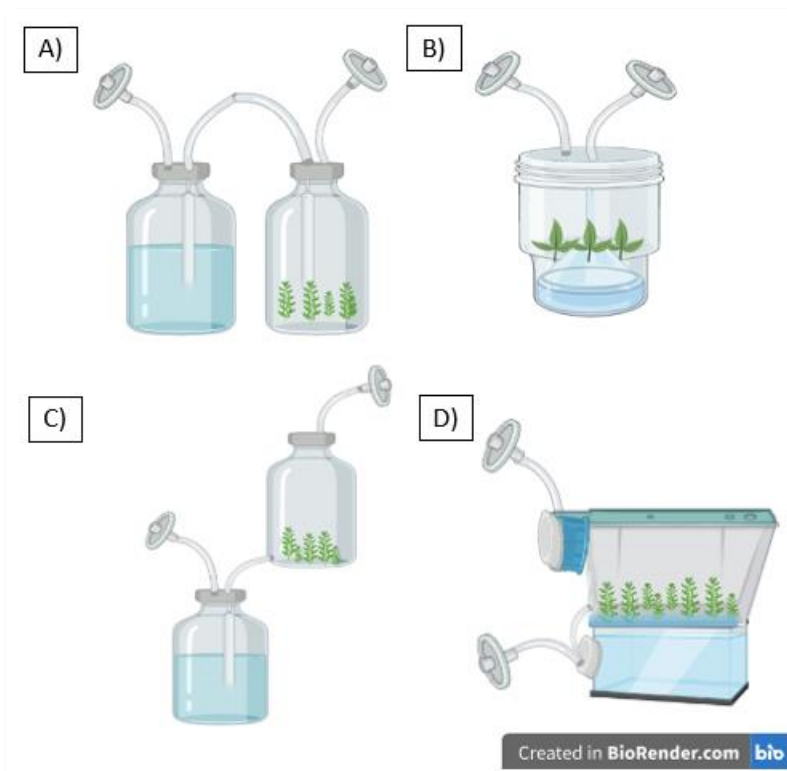


Figura 3. Sistemas de inmersión temporal. A) sistema BIT, B) sistema RITA, C) sistema BIG y D) sistema SETIS.

### ***1.8.2.2 Sistemas de inmersión temporal RITA (Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado)***

Este tipo de sistema, es conocido por contar con un recipiente dividido en dos partes, una superior y una inferior, donde cada una mantiene una función específica, en el caso del compartimento superior, este contiene al material vegetativo, mientras que la parte inferior contiene el medio de cultivo, además cuentan con un sistema de aireación, el cual va conectado a filtros hidrofóbicos, uno central y uno lateral (Figura 3, inciso B), ambos con un tamaño de poro de  $0.2\mu\text{m}$ , esto para impedir el paso de bacterias a través de ellos (Arredondo, 2019). Una vez conectados los filtros a recipientes se hace pasar un flujo de aire a presión, que provoque la transferencia de medio de cultivo desde el compartimento inferior al superior, por un corto periodo de tiempo, en algunas ocasiones estos se programan, para que las inmersiones estén ocurriendo durante diferentes intervalos de tiempo, durante el día (Arredondo, 2019).

Los sistemas de inmersión temporal RITA de acuerdo con Arredondo (2019), tienen la ventaja de que al ser individuales los problemas de contaminación y por consiguiente la pérdida de biomasa se reduce, sin embargo suele ser costoso debido a que las piezas que se utilizan para armarlo, provienen del extranjero, lo que lo hace poco escalable, además de que su capacidad es pequeña, otra desventaja que puede llegar a tener este sistema es que la produce una mayor hiperhidricidad y oxidación de los explantes, (Arredondo, 2019; Bello *et al.*, 2017).

### ***1.8.2.3 Sistemas de inmersión temporal BIG (Biorreactor de Inmersión por Gravedad)***

Este sistema consiste en dos frascos, los cuales se encuentran comunicados, a través de una manguera de silicona, por la cual se hace pasar un flujo de aire previamente esterilizado, con ayuda de filtros hidrofóbicos, que cuentan con un tamaño de poro de  $0.2\mu\text{m}$ , este tipo de biorreactores presentan solo con una válvula de solenoides, la cual permite el flujo de aire proporcionado por el compresor, que ayudará a movilizar el medio de cultivo, encontrado en uno de los frascos, hacia el recipiente donde se mantiene a la planta, para llevar a cabo la inmersión, y una vez pasado el tiempo de inmersión, se restringe el paso de aire, y el medio al ya no tener la presión de flujo de aire, comienza a descender por gravedad (Figura 3, inciso C) hacia su recipiente original (Ávila, 2018; Arredondo, 2019).

El biorreactor de inmersión por gravedad, presenta grandes ventajas, con respecto a que es de fácil operación, ya que solo cuenta con una válvula de solenoides y esta no debe coordinarse con ninguna otra, además es de bajo costo ya que se ahorra la electricidad del sistema neumático y su capacidad es variable en cuanto al volumen de planta, lo que lo hace muy versátil, sin embargo, tiene la desventaja de la contaminación, ya que al estar conectados un frasco con otro, si alguno de estos presentara contaminación, es muy fácil de que se propague esta al resto de frascos, ya que todos se encuentran interconectados (Arredondo, 2019; Bello *et al.*, 2017) .

#### ***1.8.2.4 Sistemas de inmersión temporal SETIS***

El modelo de sistema de inmersión temporal SETIS presenta al igual que otro tipo de biorreactores dos recipientes, uno ensamblado al otro, los cuales cuentan con salidas en la parte inferior de cada uno de ellos, y se encuentran interconectados a través de una manguera de silicona, misma que permite el flujo de medio de cultivo entre los contenedores provocado por una presión de aire (Figura 3, inciso D), el cual debe pasar previamente a través de filtros que lo purifiquen para evitar contaminación en el biorreactor (Navarrete, 2019).

Este tipo de sistema de inmersión temporal tiene ciertas ventajas, una de ellas es que la planta tiene una mayor exposición a la luz, debido a la forma horizontal de los contenedores, esto ayuda a que se tenga una mayor producción de clorofila, además presenta un volumen ideal para una propagación masiva de explantes, por lo que permite obtener plantas de buena calidad, sin embargo, su principal desventaja es que resulta ser una tecnología costosa (Mancilla, 2021).

### **1.9 Estudios previos**

Colmenares y Jiménez en el 2003 realizaron una investigación en Venezuela donde se aplicó un sistema de inmersión temporal para la multiplicación *in vitro* de musáceas. Con la finalidad de minimizar costos en la fase de establecimiento se redujo el número de días para la iniciación *in vitro* a solo 7, utilizaron un medio de cultivo líquido, adicionado con un 15% de agua de coco y sin reguladores de crecimiento. Evaluaron los índices de multiplicación en banano cv. Williams y Plátano Hartón, y tiempos de inmersión de 2 a 20 min cada 4 horas obteniendo resultados muy similares en la multiplicación, con un índice promedio de 8,4 para banano cv. Williams y un 11,2 en

Plátano Hartón, mientras que en el medio de cultivo sólido 2,4 y 4,3 en ese orden. Por lo que con estos resultados demostraron que la técnica de inmersión temporal es adecuada para mejorar sustancialmente los índices de multiplicación en musáceas respecto a los protocolos convencionales.

En 2015 Alvarenga y Salazar, realizaron una investigación, donde compararon la propagación de *Stevia rebaudiana*, a través de medios líquidos en dos sistemas de inmersión temporal, RITA® y frascos gemelos BIT, además del cultivo en medio semisólido para determinar el más eficiente. De manera general observaron que se obtenían plantas más vigorosas y con bajos niveles de hiperhidricidad, utilizando los sistemas de inmersión temporal. En el caso del sistema RITA® se obtuvo el mayor promedio de hojas y brotes con una frecuencia de inmersión de 10 minutos cada 8 horas, mientras que en el sistema BIT fue en el tratamiento de 10 minutos cada 12 horas, en este último además se obtuvo un incremento en la longitud, masa seca y fresca promedio. Aunado a lo anterior los autores determinaron que el cultivo *in vitro* mediante sistemas de inmersión temporal (RITA® y BIT) trae como ventaja un mayor escalamiento en la producción y favorece el proceso de aclimatación.

Bahi y Pérez (2020), realizaron una investigación con morera (*Morus alba* L.), la cual es una planta originaria del Himalaya que sirve para la elaboración de forrajes, gracias al alto valor nutricional que posee, y a las excelentes cualidades de alimentación en distintas especies. La finalidad de esta investigación fue determinar el tiempo y frecuencia de inmersión más adecuado para la micropropagación de brotes de morera variedad Doña Betty mediante un sistema de inmersión temporal SETIS™. Para el estudio se tomaron en cuenta tres tiempos, 1, 2 y 3 minutos, así como tres frecuencias de inmersión, cada 4, 6 y 8 horas, con 30 explantes por frasco. La evaluación se llevó a cabo en el día 28 y se determinaron el número de brotes, su longitud, número de hojas y segmentos nodales. Al final del estudio se logró incrementar la calidad y cantidad de brotes de morera variedad Doña Betty utilizando 2 minutos de inmersión cada 8 horas en el sistema SETIS™

Ayub *et al.* (2019), desarrollaron una investigación la micropropagación de zarzamora debido a la necesidad de obtener plantas con alta calidad fitosanitaria. El objetivo del trabajo fue evaluar el mejor volumen de medio de cultivo y concentración de sacarosa para la micropropagación de mora en un biorreactor de inmersión temporal. Se



segmentaron brotes de zarzamora *in vitro* conteniendo dos yemas y un entrenudo (1.0 cm) y se colocaron en medio MS suplementado con inositol ( $0.1 \text{ g L}^{-1}$ ), BAP ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) y sacarosa (10, 20, 30 o  $40 \text{ g L}^{-1}$ ) a diferentes volúmenes de medio (150, 175 y 200 mL). La longitud total, el número de hojas, el número de brotes y el número de brotes hiperhídricos se evaluaron 56 días después del inicio del proyecto. Para el desarrollo y propagación de la zarzamora en un sistema de biorreactor, los mejores resultados se mostraron a un volumen medio de 175 ml y una concentración de sacarosa de  $20 \text{ g L}^{-1}$ .

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material Biológico

#### 2.1.1 Selección de la planta madre

1. Para la recuperación de la planta en campo, se utilizaron las raíces de plantas visiblemente sanas, con un crecimiento activo y vigoroso. Las raíces fueron lavadas con agua corriente para la remoción de residuos de tierra, y además tratadas con una solución de captan al 2% para la eliminación de posibles hongos.
2. Una vez tratadas las raíces se colocaron en charolas con sustrato para propiciar la brotación y obtención de plantas nuevas.
3. Las plantas que lograron brotar en la charola fueron trasplantadas en macetas de 3 Kg, para mejorar su desarrollo, se trataron nutricionalmente con una solución universal de Steiner (1966) con la finalidad de obtener nuevos brotes.
4. Los nuevos brotes de la planta, dieron lugar a ramas de las que se extrajeron las varetas, que se utilizaron para recuperar las yemas laterales y apicales, usadas en la desinfección y establecimiento de los explantes en cultivo *in vitro*.

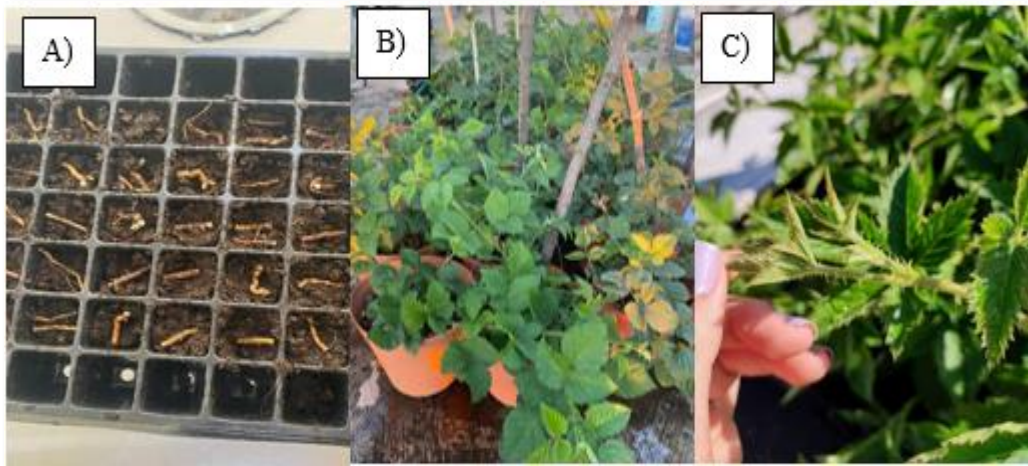


Figura 4. Obtención y crecimiento de la planta madre A) Raíces de planta de zarzamora variedad Tupy limpia y sembradas en charola con sustrato. B) Planta de zarzamora variedad Tupy, dos meses después de la brotación de raíces. C) Yemas apicales de zarzamora variedad Tupy.

### **2.1.2 Desinfección del material biológico.**

Se evaluaron tres protocolos de desinfección, modificados de la metodología de Lambardi *et. al*, (2013) y Valdivia, (2019), para poder determinar el más eficiente, (con un menor porcentaje de contaminación). Para su evaluación se utilizaron 20 explantes.

- **Tratamiento 1 con Tecto 60**

1. Se recuperaron ápices yemas laterales jóvenes (tres primeras yemas) de varetas de la planta madre de zarzamora, las cuales fueron cortadas a 1 cm aproximadamente, y posteriormente fueron lavadas con una solución de agua y cloro comercial Cloralex al 0.5% (v/v), adicionado con 2 gotas de Tween 20 para eliminar impurezas con las que pudiera venir la planta. Además, de retirar algunas ceras naturales para que los agentes desinfectantes puedan penetrar mejor (este tratamiento se realizó durante 5 minutos).
2. Se realizó un lavado con Tecto 60, un fungicida comercial sistémico de amplio espectro al 0.2% (m/v), durante 15 minutos.
3. Se recuperaron los explantes del lavado y fueron colocados en una solución de un bactericida de grado alimentario, plata ionizada al 0.5% (v/v) marca Microdyn, por 15 minutos (figura 5, inciso A).
4. Después del lavado, los explantes fueron llevados a campana de flujo laminar para proporcionar junto con los mecheros condiciones de esterilidad al momento de su manejo.
5. En campana de flujo laminar, se aplicó un lavado con una solución de hipoclorito comercial Cloralex al 2.5% (v/v) y agua estéril, en la cual permaneció la planta durante 10 minutos.
6. Los explantes fueron retirados de la solución, y se les aplicó un lavado con solución de alcohol 70% y agua estéril, durante 2 minutos.

7. Pasado el tiempo de desinfección, los explantes fueron enjuagados con agua estéril. Posteriormente, fueron sembrados e incubados como se indica en el punto 7.1.4.

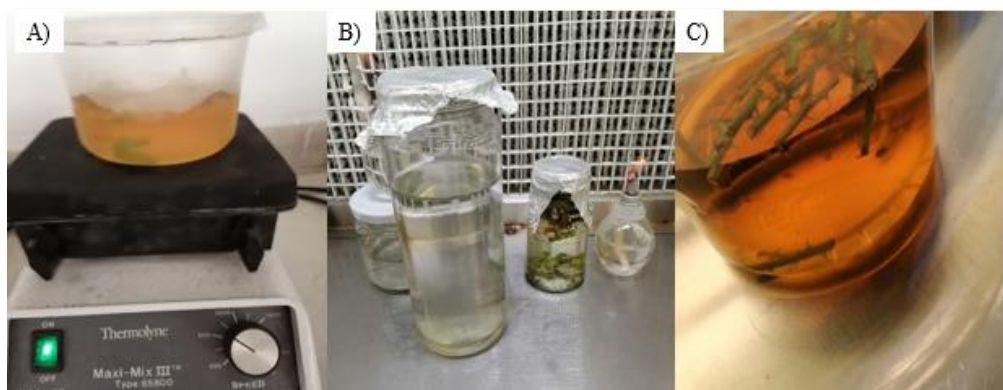


Figura 5. Tratamiento de desinfección. A) tratamiento 1 lavado de explantes con plata ionizada al 0.5 % (v/v), B) tratamiento 2 lavado con alcohol al 70% (v/v), C) tratamiento 3 lavado de explantes con nanopartículas de plata concentradas al 0.35%.

- **Tratamiento 2 lavado convencional con hipoclorito de sodio y alcohol**

1. Se tomaron varetas de la planta madre de zarzamora y se rescataron las yemas axilares, cortadas a un 1 cm y se sometieron a un primer lavado con una solución de hipoclorito de sodio, marca Cloralex 5 mL·L<sup>-1</sup> de agua con 5 gotas de jabón líquido, y se mantuvo en agitación por 5 min.
2. Los explantes se recuperaron de la solución y fueron llevados a una solución de cloro al 2% (v/v) con dos gotas de Tween 20, durante 10 minutos.
3. Se realizó un tercer lavado con el bactericida Microdyn al 2% (v/v) mL de agua y se mantuvo en agitación por 15 min.
4. En campana de flujo laminar, se realizó un lavado con etanol al 70% durante 8 minutos (figura 5, inciso B).
5. Los explantes fueron colocados en una solución de cloro al 50%, y se mantuvieron ahí por 15 min.

6. Se realizó un enjuague con agua destilada estéril para eliminar los residuos de los desinfectantes. Los explantes fueron sembrados e incubados como se indica en el punto 7.1.4.

- **Tratamiento 3. Desinfección con Nanopartículas de plata**

1. Las varetas de planta madre de zarzamora, se cortaron a un 1 cm aproximadamente, buscando que dentro de este fragmento se encuentren las yemas laterales, que se pasaron a la asepsia correspondiente.
2. Los explantes fueron lavados bajo una solución de hipoclorito de sodio comercial Cloralex 5 mL·L<sup>-1</sup> de agua y 5 gotas de jabón líquido, por un periodo de 5 minutos.
3. Posteriormente se aplicó un segundo lavado, con una solución de cloro al 2% y 2 gotas de Tween 20, con la finalidad de retirar las ceras naturales del material vegetativo, mejorando la permeabilidad de éste hacia los agentes desinfectantes. Esto durante 15 minutos.
4. Se empleó un tercer lavado, con un bactericida de plata coloidal (Microdyn) al 2%, durante un periodo de 15 minutos y en constante agitación.
5. Luego del tercer lavado, los explantes fueron llevados a condiciones estériles, es decir bajo campana de flujo laminar.
6. Una vez dentro de la campana de flujo laminar, se realizó un cuarto lavado, con una solución alcohol al 70%(v/v) con agua estéril por un periodo de 8 minutos, en constante agitación.
7. Al finalizar el lavado con alcohol al 70%, se aplicó un lavado con cloro al 50% (v/v) con agua estéril, en el cual permanecieron los explantes por 15 minutos.
8. Se realizó un enjuague con agua destilada estéril para eliminar residuos.
9. Se realizó un lavado con nanopartículas de plata concentradas al 0.35%, durante 30 minutos (figura 5, inciso C).
10. Finalmente se hizo un enjuague más con agua destilada estéril, para la eliminación de residuos de agentes desinfectantes anteriores. Los explantes fueron sembrados e incubados como se indica en el punto 7.1.4.

### ***2.1.3 Elaboración de medio de cultivo para fase de establecimiento***

Modificación de la metodología de Ugarte *et al.* (2016), los pasos para la preparación del medio de cultivo son los siguientes:

1. Se utilizó medio basal Murashige Skoog (1962) (cuadro 2) con vitaminas, de la marca Phytotechnology, del cual se agregaron  $4.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de agua y se dejó al 100% de sales.
2. Se añadió sacarosa  $30 \text{ g L}^{-1}$  de medio como fuente de energía.
3. Se agregó Gelrite como gelificante  $8 \text{ g L}^{-1}$  de medio, se agitó y se colocó al fuego hasta alcanzar los  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , temperatura a la que suele disolverse mejor el gelificante.
4. El medio se colocó en los frascos tipo gerberg, aproximadamente 50 mL por cada envase y se taparon.
5. Los frascos fueron colocados en una autoclave convencional de calor húmedo para su esterilización, la cual se llevó a cabo a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 20 minutos, a  $1.5 \text{ Kg/cm}^2$  de presión.
6. Los frascos con medio de cultivo se almacenaron por 5 días para verificar que no hubiese crecimiento de bacterias u hongos y poder usarlos.

### ***2.1.4 Siembra del material biológico***

De acuerdo con la modificación a la técnica de (Sigarroa y García, 2011) los explantes desinfectados siguen los siguientes pasos:

1. Los explantes fueron secados por medio de toallas de papel absorbentes, previamente esterilizadas, colocados por encima mediante pinzas de disección, el secado se realizó con la finalidad de disminuir la humedad de en los tejidos, y evitar la proliferación de hongos una vez plantados.
2. Ya secos los explantes, fueron sembrados en medio de cultivo estéril con un máximo de 4 explantes por cada frasco.
3. Posteriormente se llevaron a incubación, donde permanecieron de 4 a 6 semanas aproximadamente bajo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, a una temperatura de  $25^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$ .



Figura 6. Explantes de zarzamora variedad Tupy sembrados en medio de cultivo MS al 100% de sales.

## 2.2 Armado del Sistema de Inmersión Temporal

1. Para el armado del sistema de inmersión temporal BIT se utilizaron frascos de cristal, 2 por cada sistema uno para el medio de cultivo y otro para colocar la planta.
2. El frasco que contiene la planta cuenta con un trozo de poliuretano de aproximadamente 5 mm de espesor y un diámetro ideal para cubrir el fondo del frasco, la esponja tiene la función de no dejar que los explantes se queden en el fondo del frasco y evitando que se mantengan inmersos en el residuo de medio de cultivo que se queda una vez que es retirado.
3. A cada frasco se le colocó una tapa plástica, que cuenta con dos orificios, uno en el centro de la tapa y otro en la orilla. En los orificios se colocaron conectores plásticos, los cuales fueron fijados con tuercas plásticas (Figura 7, inciso A).
4. En cada conector de plásticos se insertaron mangueras de silicona, y en los conectores del centro de cada tapa se colocó por la parte de abajo un tubo de acero inoxidable que es por donde pasa el medio de cultivo para ir de un frasco a otro.
5. Al tubo de acero inoxidable colocado en el frasco que mantiene a la planta, se le insertó un círculo de polietileno, el cual está perforado para poder ser insertado en el tubo. El círculo de polietileno funciona como un tope para que la esponja que soporta a los explantes no flote y los explantes puedan ser inmersos en el

medio de cultivo. El tubo de acero presenta una deformidad para poder sujetar al círculo de polietileno.

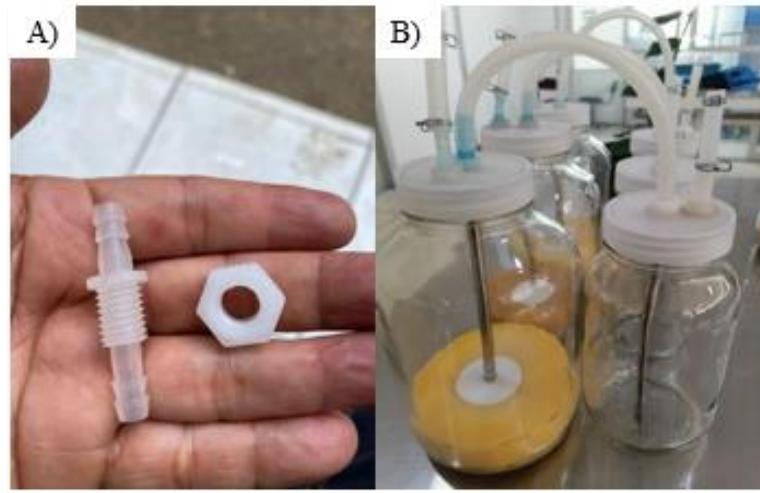


Figura 7. Armado y piezas del sistema de inmersión temporal. A) Conector plástico y tuerca de plástico. B) Sistema de inmersión temporal armando sin esterilizar.

6. Los conectores que se encuentran en el centro de las tapas de los frascos, están conectados entre sí, mediante una manguera de silicona, para que pueda fluir el medio de cultivo, además a estos mismos conectores centrales también se encuentra único un tubo pequeño de acero inoxidable, por donde pasa el medio de cultivo (Figura 7, inciso B).
7. Los conectores plásticos que fueron colocados en las orillas de las tapas de los frascos, tienen un trozo de manguera silicona para comunicar al conector plástico con un filtro de venteo, y lograr las condiciones de esterilidad que requiere el sistema. Estos filtros son hidrofóbicos y manejan un grado de retención de  $0.2\mu\text{m}$  de acuerdo con el fabricante.
8. Los filtros fueron conectados al biorreactor a través de una manguera de silicona, y a su vez a una bomba de aire, esta genera una presión positiva, que provoca que el medio de cultivo pase al frasco donde se encuentra la planta. Posteriormente para regresar la solución nutritiva a su frasco original otra bomba de aire produce una presión negativa.



9. Las bombas de aire fueron conectadas a la corriente eléctrica mediante unos contactos inteligentes con conexión *wi-fi* de la marca Steren. Los contactos fueron controlados a través de una aplicación móvil (Steren Home), en la que se programaron los horarios de encendido y de apagado de ambas bombas para cada sistema.

### **2.3 Evaluación de frecuencias de inmersión en sistema BIT con los explantes de Zarzamora**

1. Se ensamblaron los frascos con sus tapas, conectores, tubos de acero inoxidable, mangueras de silicona, tal como se describe en el punto anterior y se envolvieron en bolsas plásticas para ser esterilizados a 121 °C, durante 20 minutos, a 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> de presión. Cabe mencionar que los filtros de venteo se envolvieron en papel aluminio para evitar la absorción de humedad.
2. Se preparó medio litro de medio de cultivo Murashige Skoog (1962) con vitaminas, de la marca Phytotechnology, y se agregaron 4.4 g L<sup>-1</sup> de agua, el medio se mantuvo al 100% de sales y se le adicionó azúcar 30 g L<sup>-1</sup> de medio como fuente de energía.
3. Se esterilizó el medio de cultivo a 121 °C, durante 20 minutos, a 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> de presión.
4. Una vez estériles, tanto el sistema armado como el medio de cultivo, se procedió a realizar el vaciado del medio en el frasco del sistema bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.
7. Posteriormente se tomaron 10 plantas de Zarzamora, que estaban previamente establecidas en condiciones *in vitro*, para ser colocadas sobre la esponja de poliuretano en uno de los frascos del sistema.
8. EL sistema se cerró y fue sellado con Kleen Pack para tratar de evitar contaminaciones del exterior, e inmediatamente se conectó el sistema por medio de los filtros a las mangueras de las bombas de aire.
9. Las bombas de aire fueron conectadas a la corriente eléctrica por medio de los contactos inteligentes Steren con Wi-fi, para ser programados. Para cada sistema

se programaron dos bombas de aire, una que proporcionaba una presión positiva, ocasionando que el medio de cultivo subiera hacia el frasco con los explantes (Figura 14), permaneciendo activa por 5 min (inmersión), para después apagarse y a los 30 segundos encender la segunda bomba generando una presión negativa y por ende que el medio de cultivo regrese a su frasco inicial.

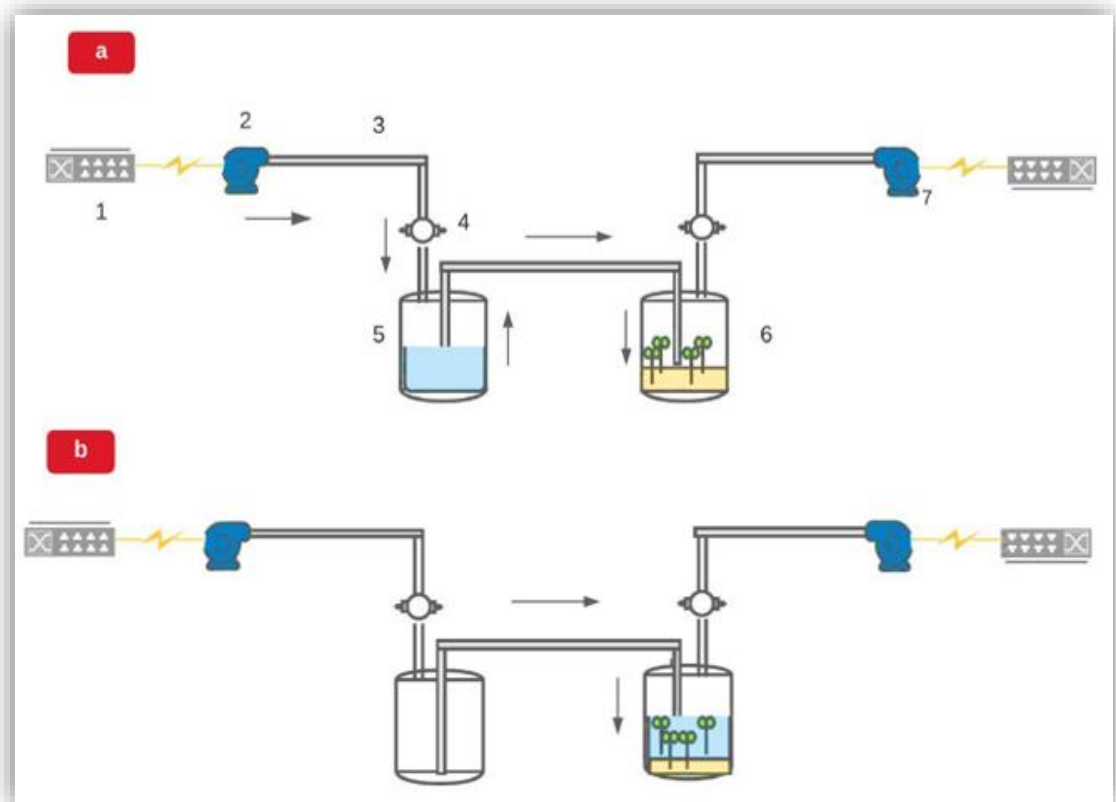


Figura 8. Diagrama del sistema de inmersión temporal BIT. A: Sin inmersión. B: Con inmersión. 1: Contacto eléctrico *wi-fi*, 2: Bomba de aire presión positiva, 3: Manguera de silicona, 4: Filtro de venteo, 5: Contenedor con medio de cultivo, 6: Contenedor con explantes, 7: Bomba de aire con presión negativa.

10. Este proceso se realizó para cada uno de los tratamientos, se colocaron 7 sistemas de inmersión temporal bajo las siguientes condiciones (Cuadro 3), tomando cada uno como un tratamiento, y cada planta como unidad muestral.

Cuadro 3. Frecuencias y tiempos de inmersión

Variables	Tratamientos						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Número de inmersiones por día	2	3	4	5	6	7	8
Frecuencia de Inmersión	Cada 12 horas	Cada 8 horas	Cada 6 horas	Cada 4.8 horas	Cada 4 horas	Cada 3.4 horas	Cada 3 horas
Tiempo de inmersión	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min

#### 2.4 Evaluación de un bactericida comercial PPM en medio de cultivo bajo un sistema de inmersión temporal

Se preparó medio de cultivo al 50% de nutrientes para evaluar la cantidad de semanas que el medio de cultivo permanecía sin contaminación, de acuerdo con Hub *et al* (2015), al utilizar hasta  $1 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$  de PPM se obtienen buenos resultados en la inhibición de bacterias. Sin embargo, el proveedor indica que su uso es efectivo y seguro de  $0.5$  a  $2 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ , por lo que en este experimento se decidió utilizar la concentración de  $2 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ , posteriormente el medio se esterilizó a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 15 minutos, a  $1.5 \text{ Kg/cm}^2$  de presión en autoclave, finalmente fue vaciado al sistema de inmersión temporal. Cabe resaltar que en este experimento no se colocaron explantes.

#### 2.5 Evaluación de un bactericida comercia PPM en un sistema de inmersión temporal con explantes de zarzamora.

Se preparó medio de cultivo MS al 50% de sales adicionado con  $2 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$  de PPM, sacarosa al 3%, pH 5.65 y se colocó dentro del sistema de inmersión temporal una vez esterilizado a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 15 minutos, a  $1.5 \text{ Kg/cm}^2$  de presión en autoclave. Además, se colocaron 5 explantes de zarzamora, y se evaluó el tiempo que este permaneció sin presentar contaminación.

## **2.6 Evaluación del porcentaje de sales MS para la planta de zarzamora en sistema de inmersión temporal.**

Se realizaron dos tratamientos con medio de cultivo MS, uno con sales al 75% y pH 5.75, mientras que el otro con sales al 100% y pH de 5.70. Ambos fueron adicionados con  $2 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  de PPM como preservativo de la planta y se agregó sacarosa al 3% como fuente de energía. En este experimento se evaluó la longitud de los explantes a las 2,5 y 13 semanas.

## **2.7 Evaluación del efecto la citoquinina BAP (6-benzilaminopurina) en la organogénesis de planta de zarzamora para su micropropagación.**

Se evalúan cuatro tratamientos en el que se utiliza un medio base de sales MS al 100% de concentración adicionado con  $2 \text{ mL L}^{-1}$  de PPM y sacarosa al 3%. El tratamiento 1 no presenta ninguna concentración de BAP, mientras que el tratamiento 2 cuenta con  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , al tratamiento 3 se le agregaron  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP y finalmente el tratamiento 4 que cuenta  $3 \text{ mg L}^{-1}$  del mismo regulador, estos cuenta con la evaluación cero y con la primera que se realizó a los quince días. En esta evaluación se tomó en cuenta la longitud de los explantes, el número de nudos, y la cantidad de hojas, para de esta manera saber cuál es la mejor concentración de BAP para la multiplicación de los explantes.

## **2.8 Evaluación comparativa entre planta en medio de cultivo semisólido y en un sistema de inmersión temporal bajo dos concentraciones de BAP.**

Se realizó una comparación entre planta en un sistema de inmersión temporal y planta sometida a medio semisólido, ambas se evaluaron tras 6 semanas de incubación bajo las mismas condiciones de temperatura y luz, en el mismo cuarto de incubación, con un fotoperiodo de 16 horas luz, 8 de oscuridad. Cabe resaltar que para ambas comparaciones se utilizó medio de cultivo MS al 100% de sales,  $2 \text{ mL L}^{-1}$  de PPM y sacarosa al 3%. Se realizaron tres tratamientos el T1 fue planta sembrada en medio semisólido que no presentaba ningún regulador de crecimiento exógeno pero si un gelificante (agar-agar  $8 \text{ g L}^{-1}$ ), mientras que el T2, era planta sembrada en medio semisólido con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP y gelificante ( $8 \text{ g L}^{-1}$  de agar-agar), finalmente se compararon con el T3 (sistema 2) el cual fue un sistema de inmersión temporal con 6 inmersiones por día, adicionado con  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de BAP, y un T4 (sistema 1) llevado a las

mismas inmersiones que el anterior, solo con la diferencia de que este no presentó ningún regulador de crecimiento.

Se comparó la longitud de los explantes, el número de nudos, el número de hojas y finalmente el número de brotes, esto para revisar la eficiencia de los sistemas de inmersión temporal con respecto a las técnicas convencionales de micropropagación *in vitro* a través de medio semisólido.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Desinfección y establecimiento de yemas de zarzamora

Se probaron tres protocolos de desinfección en yemas apicales y axilares de zarzamora, para poder determinar un tratamiento que presente un mayor porcentaje de planta no contaminada. En total se realizaron tres repeticiones obteniéndose porcentajes de 91.4% en el T<sub>1</sub>, mientras que para el T<sub>2</sub> del 32.06% y finalmente en el T<sub>3</sub> de 31.85% de planta no contaminada (Figura 9).

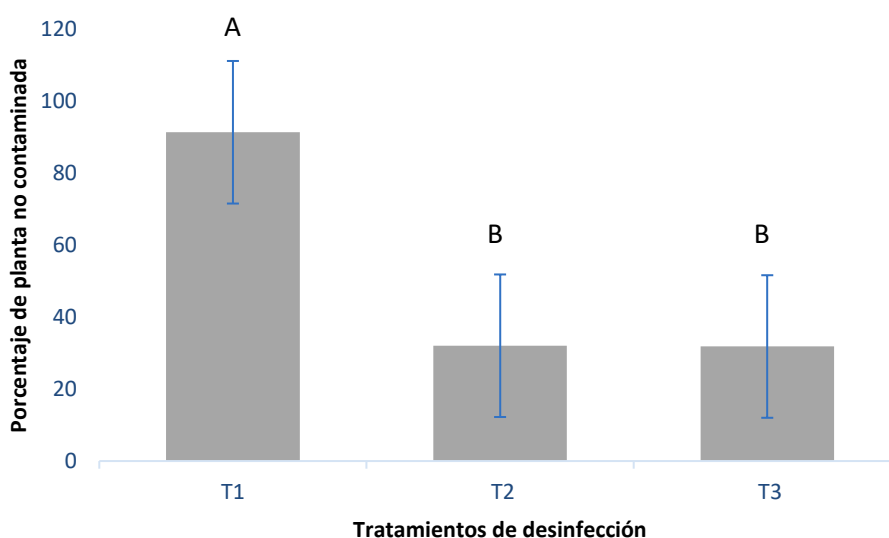


Figura 9. Evaluación de tres protocolos de desinfección con respecto al porcentaje de planta establecida T1: Desinfección con Tecto 60, T2: Desinfección convencional con hipoclorito de sodio y alcohol T3: Desinfección con nanopartículas de plata. Letras diferentes indican significancia estadística (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) entre columnas.

El análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey, muestran que el tratamiento 1 es distinto, presentando la media de planta no contaminada más alta con un 91.4%, demostrando que el tratamiento 1 es la mejor opción de desinfección para yemas de zarzamora variedad Tupy, en comparación con los otros dos tratamientos.

Bedoya *et al.* (2016) obtuvieron buenos resultados al utilizar un fungicida sistémico y un bactericida (Benomil 2 g L<sup>-1</sup> bactericida Gentamicina 2 ppm, un durante un minuto) como parte de uno de sus tratamientos de desinfección en *Aloysia tryphilla*, con el cual generó un porcentaje de contaminación de  $21.1 \pm 6.9$ , tratamiento que fue comparado

con uno de  $\text{HgCl}_2$  al 0,2% (p/v), en el cual se expuso a la planta por 5 min y se logró un 90% de planta no contaminada, sin embargo, existe bastante controversia con respecto a utilizar este químico debido a su alta toxicidad y daño al medio ambiente.

Con el tratamiento 1 aplicado a las yemas axilares y apicales de zarzamora se logró un porcentaje bastante similar a lo que consiguió Bedoya *et al.* (2016) con su tratamiento de  $\text{HgCl}_2$  al 0,2% (p/v), pero con la ventaja de que los agentes desinfectantes utilizados no presentan la misma toxicidad y riesgo al medio ambiente.

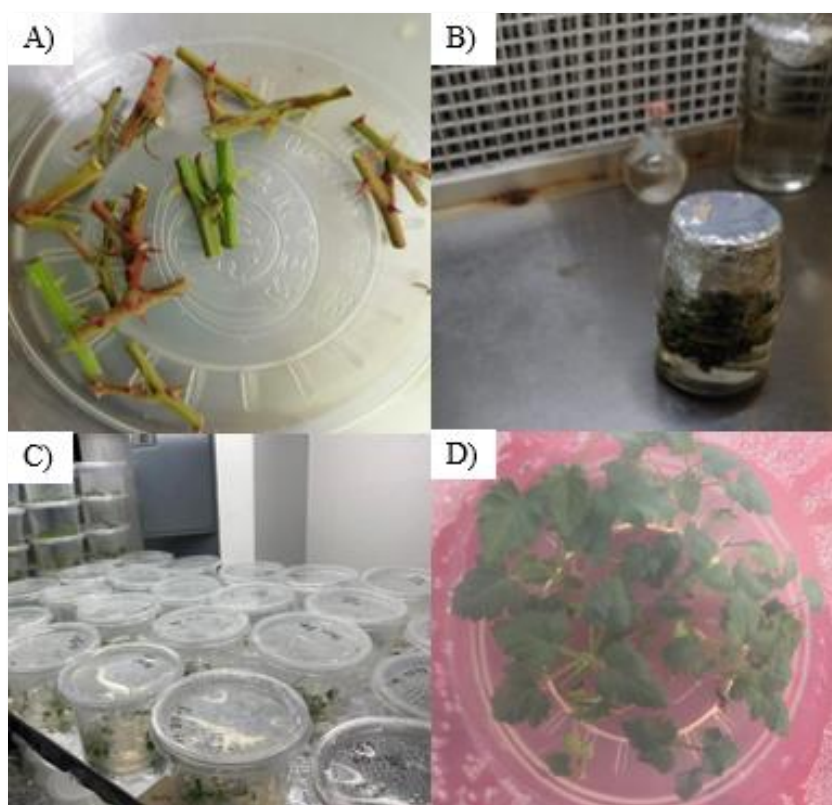


Figura 10. Desinfección y establecimiento de zarzamora A) Yemas axilares de Zarzamora, para desinfección. B) Desinfección de yemas de Zarzamora. C) Incubación de explantes de Zarzamora. D) Plántulas de Zarzamora desarrolladas y establecidas bajo condiciones *in vitro*.

### 3.2 Armado del sistema

Se logró armar un sistema de inmersión BIT funcional para investigación, el cual pudo ser semi-automatizado a través de la conexión de las bombas de aire a unos interruptores que pueden programarse para que se enciendan o se apaguen según se requiera por medio de una aplicación para celular. Posteriormente, se realizaron pruebas para

observar si el medio de cultivo pasaba adecuadamente al frasco donde se encuentran las plantas y una vez pasado el tiempo de inmersión se dejaban pasar algunos segundos y se procedía a colocar una presión inversa para regresar el medio de cultivo a su sitio. En ambos casos el medio de cultivo fluyó en ambos frascos sin ninguna dificultad, con lo que se comprobó la funcionalidad del sistema.



Figura 11. Sistema de inmersión temporal BIT funcional para investigación

### **3.3 Evaluación de frecuencias de inmersión en sistema BIT con los explantes de Zarzamora**

Se montaron cuatro sistemas de inmersión temporal y a cada uno de ellos se le colocaron 10 explantes, los cuales estuvieron en inmersión con un medio de cultivo idéntico, al 100% de sales MS. Los sistemas de inmersión temporal se mantuvieron bajo las mismas condiciones de luz y temperatura durante su incubación, lo único que se modificó fueron las frecuencias de inmersión, en el T<sub>1</sub> se tuvieron dos inmersiones por día (una cada 12 horas), el T<sub>2</sub> tuvo inmersiones cada 8 horas, el T<sub>3</sub> cada 6 horas (cuatro inmersiones por día), el T<sub>4</sub> cada 4.8 horas, un T<sub>5</sub> con seis inmersiones por día, el T<sub>6</sub> con siete y finalmente un T<sub>7</sub> que realizaba ocho inmersiones por día (cada 3 horas).



Se realizaron algunas observaciones en cuanto a la supervivencia de los explantes, en cada uno de los tratamientos se evaluó la cantidad de explantes vivos y muertos. Se tomó cada explante como unidad muestral obteniéndose los siguientes resultados:

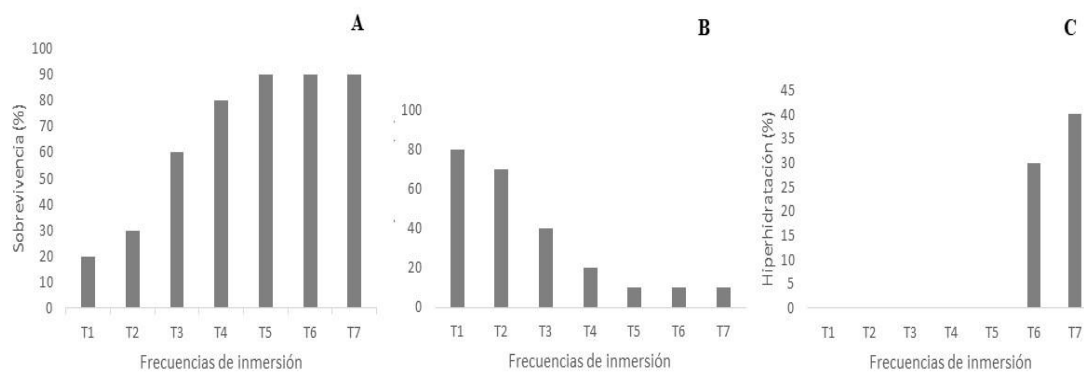


Figura 12. Evaluación de supervivencia (A), necrosis y muerte (B) e hiperhidricidad en explantes (C), en diferentes tratamientos de frecuencias de inmersión temporal. T1: 2 inmersiones por día (1 cada 12 horas), T2: 3 inmersiones por día (1 cada 8 horas), T3: 4 inmersiones por día (1 cada 6 horas), T4: 5 inmersiones por día (1 cada 4.8 horas). T5: 6 inmersiones por día (1 cada 4 horas), T6: 7 inmersiones por día (1 cada 3.4 horas) y T7: 8 inmersiones por día (1 cada 3 horas).

Para estas pruebas no se realizó un análisis de varianza, debido a que se tenían pocos datos para hacerlo, ya que no pudo realizarse el triplicado a falta de sistemas de inmersión temporal. Sin embargo, en esta corrida experimental, puede observarse que los tratamientos 5, 6 y 7 presentan un 90% de supervivencia de la planta, por lo que son los que tienen un mejor resultado (Figura 12-A), sin embargo, tanto el tratamiento 6 como el 7 presentan un porcentaje de hiperhidricidad de un 30 y 40% (Figura 12-C), mientras que la necrosis se mantiene en un 10% para los tres tratamientos (Figura 12-B).

Por otro lado, se encuentran los primeros 4 tratamientos, en los que se puede notar como en un inicio en el T<sub>1</sub> se tiene un 80% de muerte, y posteriormente a medida que aumenta el número de inmersiones a la planta, el porcentaje de muerte va disminuyendo, para el T<sub>2</sub> con un 70%, el T<sub>3</sub> con un 40% y en el T<sub>4</sub> con un 20%, lo cual indica que hay una relación lineal negativa (Figura 12-B), es decir a medida que aumenta el número de inmersiones el porcentaje de necrosis y muerte disminuye, y esto puede observarse hasta el T<sub>5</sub> en el que se alcanza un 10%, el cual se mantiene igual en el T<sub>6</sub> y T<sub>7</sub> (Figura 12-B).

La razón por la que se observa un comportamiento lineal negativo entre el número de inmersiones y el porcentaje de muerte (Figura 12-B), es debido a que, al existir un menor número de inmersiones, los tejidos de los explantes comienzan a sufrir deshidratación por eso a medida que aumenta el número de inmersiones la planta se deshidrata menos y hay menos pérdida de explantes por necrosis o muerte. Esto se debe principalmente a que al tener menos inmersiones existe poca asimilación de los nutrientes del medio, además de que hay una menor renovación de la atmósfera dentro del sistema, lo cual puede provocar la acumulación de gases que pueden causar efectos adversos a los explantes, como lo es el etileno, y a su vez restringir la disponibilidad de otros como el dióxido de carbono (García *et al.*, 2013).

Cabe mencionar que la planta también obtiene agua del medio de cultivo, y si esta se deshidrata deja de realizar varios de sus procesos metabólicos, además de perder la turgencia, aunque demasiada humedad pudiera ser perjudicial también para los explantes, ya que estos pueden sufrir hiperhidricidad, una condición en la que la planta llega a presentar características anormales, como por ejemplo, un aspecto vítreo, transparente, con un menor contenido de clorofila y por lo tanto con una menor capacidad fotosintética (Nikoloff, 2015).

De los tratamientos aplicados con distintas frecuencias de inmersión el tratamiento 5 con 6 frecuencias, fue el que presentó el porcentaje más alto, de un 90 % de supervivencia (Figura 12-A), que, aunque es idéntico al del T<sub>6</sub> y el T<sub>7</sub>, tiene la ventaja de que, bajo ese número de inmersiones por día, la planta no presentó hiperhidricidad o deshidratación (Figura 12-C), factores importantes a considerar para poder elegir la mejor frecuencia. Por lo que se consideró utilizar 6 inmersiones por día en un inicio cuando la planta es pequeña y tiene una menor superficie para retener humedad, y a medida que esta fue creciendo (6 semanas), se bajó a 5 inmersiones por día, y finalmente se quedó con 4 inmersiones por día, ya que, al crecer la planta junto con sus hojas, estas pueden retener una mayor cantidad de humedad, por lo tanto ya no es necesario que las inmersiones sean tan frecuentes para mantener hidratada a la planta, y estas se van disminuyendo.

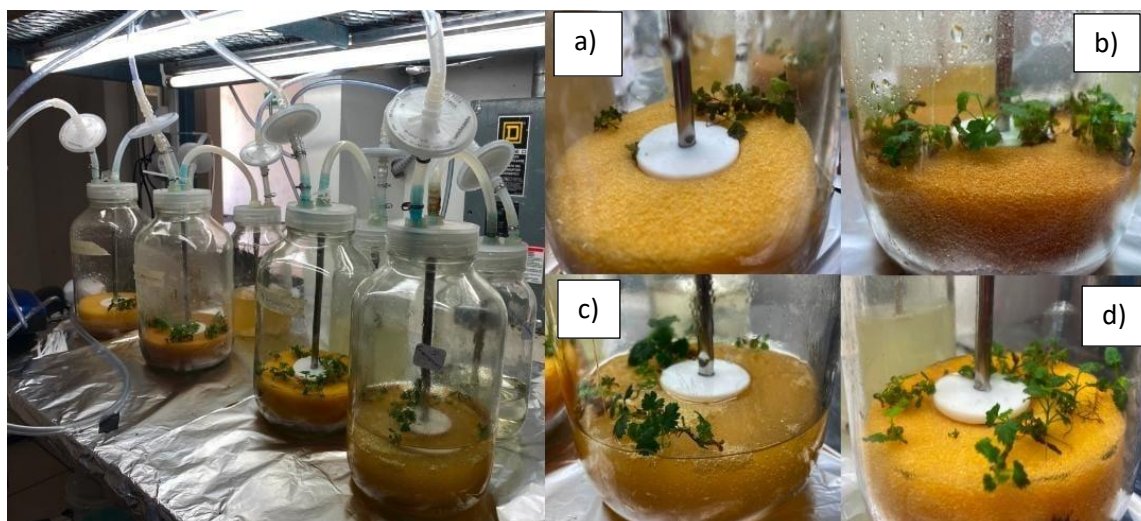


Figura 13. Sistemas de inmersión temporal para la evaluación de sobrevivencia en explantes a diferentes frecuencias de inmersión a) 2 inmersiones por día (1 cada 12 horas), b) 3 inmersiones por día (1 cada 8 horas), c) 4 inmersiones por día (1 cada 6 horas) y d) 5 inmersiones por día (1 cada 4 horas).

Delfino *et al.* (2020), consideraron tres tratamientos, uno con 2 inmersiones por día, otro con 4 inmersiones y un último con 6 inmersiones al día, en el cultivo de *Prunuspersica x p. amygdalus.*, destacando el tratamiento con 4 inmersiones, ya que obtuvo una mayor longitud de los explantes con este, mayor tasa de multiplicación, proporción de nudos con brotes y de peso seco. En comparación con las inmersiones de zarzamora el número de inmersiones efectivas para lograr un mejor desarrollo en la planta resultó ser muy similar, ya que en zarzamora fueron entre 4 y 6 inmersiones dependiendo del crecimiento y desarrollo que prestaban los explantes.

### **3.4 Evaluación de un bactericida comercial PPM en medio de cultivo sin explantes y bajo un sistema de inmersión temporal**

En un inicio cuando se montaron los sistemas de inmersión temporal, no podía evaluarse durante un tiempo largo ya que se tenía bastante contaminación desde la semana 1, la cual se presentaba como turbidez en el medio de cultivo, o con la formación de hifas visibles por la presencia de hongos, por lo que se decidió aplicar un bactericida comercial, y evaluar con el medio de cultivo sin los explantes y con explantes.

Esta evaluación se realizó solo de manera cualitativa a través de la presencia de turbidez en el medio de cultivo, con lo cual se asumió que este presentaba contaminación por

bacterias, el medio de cultivo permaneció totalmente cristalino durante 7 semanas, sin embargo, pasado este periodo el medio de cultivo comenzó a presentar cierta turbidez lo que indica que ya había presencia de bacterias creciendo en el medio de cultivo. Cabe mencionar que se utilizó la cantidad de PPM más alta recomendada por el fabricante.

### **3.5 Evaluación de un bactericida comercial PPM en un sistema de inmersión temporal con explantes de zarzamora.**

En esta evaluación se utilizó la cantidad de PPM más alta recomendada para el fabricante,  $2 \text{ mL L}^{-1}$ , para esta vez observar el comportamiento de los explantes de zarzamora, y también la presencia de contaminación, de igual manera solo a nivel cualitativo. En este caso no se observaron efectos adversos en la planta por la concentración del PPM, lo que indica que se puede seguir utilizando esta concentración para inhibir el crecimiento de bacterias en planta de zarzamora, sin causar daño a la planta. Al igual que en la prueba anterior la turbidez del medio se observó posterior a la séptima semana de montar el sistema con planta de zarzamora, lo que da un margen de siete semanas para poder evaluar ciertas características en la planta que pudieran ser útiles en otros experimentos.

Huh *et al.* (2015) realizaron pruebas con distintos biocidas en plantas de arándano, entre ellos el PPM (*Plant Preservative Mixture*), para ver el efecto que tenía no solamente en el control de microorganismo, sino también en el desarrollo de los explantes de este cultivo, utilizaron distintas concentraciones de PPM, 0, 0.5, 1, 2 y  $4 \text{ mL L}^{-1}$ , al final demostraron que el uso de PPM es eficaz a una concentración de  $1 \text{ mL L}^{-1}$  para el control de bacterias y hongos y que en niveles por encima de  $2 \text{ mL L}^{-1}$ , las isotiazolonas presentes en PPM pueden causar un efecto negativo o fitotóxico, sin embargo el mejor tratamiento fue el de  $1 \text{ mL L}^{-1}$ . Por lo que bajar la concentración de PPM a  $1 \text{ mL L}^{-1}$  en el cultivo de zarzamora a través de un sistema de inmersión temporal puede ser efectivo, además de menos costoso.

El realizar la prueba de bactericida comercial PPM en planta de zarzamora deja claro que la planta no era la que estaba provocando la contaminación, sino que después se observó que los sistemas de inmersión presentaban una pequeña fuga por lo que, al ingresar aire del medio ambiente a este presentaba contaminación y al reparar la fuga con plástiacero se ha podido lograr hasta 15 semanas sin contaminación y sin que la planta presente daños aparentes.

### 3.6 Evaluación del porcentaje de sales MS para la planta de zarzamora en sistema de inmersión temporal.

En este experimento se analizó únicamente la longitud de los explantes y se realizaron tres evaluaciones, al final se observó el incremento que tuvo cada explante tanto para el medio de cultivo al 75% de sales, como para el medio al 100% de sales (figura 14).

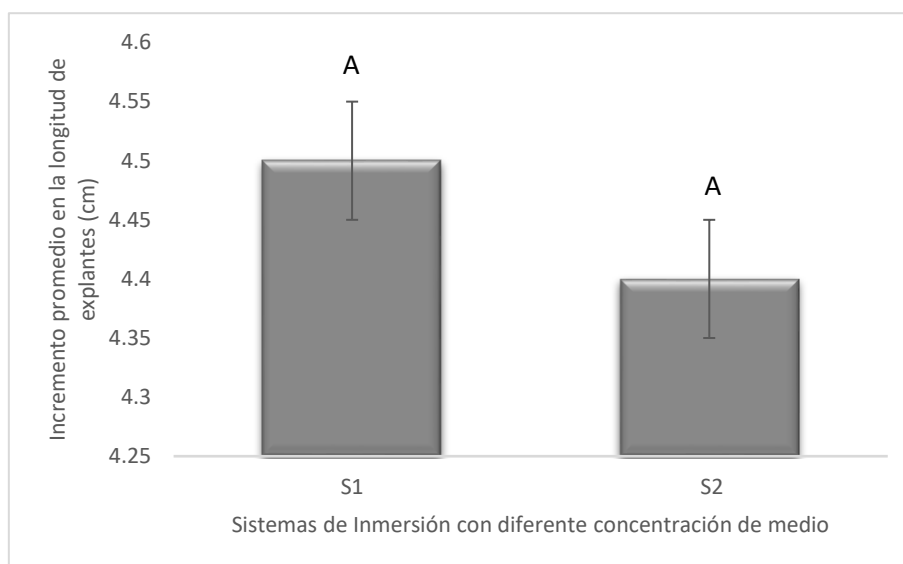


Figura 14. Evaluación del incremento en la longitud de explantes a diferentes concentraciones de medio MS en un sistema de inmersión temporal. S1: Medio de cultivo MS basal al 75% de sales adicionado con 2 mL L<sup>-1</sup> de PPM, S2: Medio de cultivo MS basal al 100% de sales adicionado con 2 mL L<sup>-1</sup> de PPM. Letras diferentes indican significancia estadística (Tukey, p≤0.05) entre columnas.

Se puede observar como el sistema 1 tiene ligeramente un mayor incremento en la longitud, sin embargo, al realizar el ANOVA correspondiente a esta evaluación no se observan diferencias (Figura 14), de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Tukey. Al no existir diferencia alguna, se concluye que puede fácilmente utilizarse un medio de cultivo basal MS al 75% de sales, ya que bajar la concentración del mismo hasta este porcentaje, claramente no influye en el crecimiento del explante y se puede ahorrar en insumos.

En el 2011, Raya *et al.*, en el cultivo de *Laelia halbingeriana*, realizaron una serie de pruebas, en las que revisaron el efecto que tenían concentraciones de 50, 75, 100, 125, 150 % de sales MS en la organogénesis *in vitro* de dicho cultivo, ellos evaluaron el

número de hojas, longitud de las hojas, número de raíces, longitud de raíces y longitud de los explantes, esto tras 60 días de incubación, con lo que no obtuvieron diferencias significativas en la longitud de explantes, hojas y raíces, así como tampoco en el número de hojas, la única evaluación que presentó diferencias fue la del número de raíces donde la media más alta fue de 2.62, de la concentración de sales al 75%. Los resultados en cuanto a la longitud de los explantes reportados por Raya *et al.* (2011), coinciden con los realizados en este experimento con zarzamora, en los que no hay una influencia directa en la longitud de explantes, incluso aunque sean cultivos distintos.

### **3.7 Evaluación del efecto de la citoquinina BAP (6-benzilaminopurina) en la organogénesis de planta de zarzamora para su micropropagación**

En este experimento se realizó una evaluación inicial y otra a las 6 semanas de colocar los sistemas para poder observar los cambios en la planta (Figura 15). Para esta evaluación se analizó la longitud de los explantes, la cantidad de nudos, el número de hojas, y el número de brotes, obteniéndose los siguientes resultados.

En cuanto a la longitud de explantes se tuvo un incremento de 0.56 cm en el S<sub>1</sub>, por su parte en el S<sub>2</sub> 5.8 cm, mientras que el S<sub>3</sub> con 5.46 y finalmente el S<sub>4</sub> 1.73 (Figura 16).

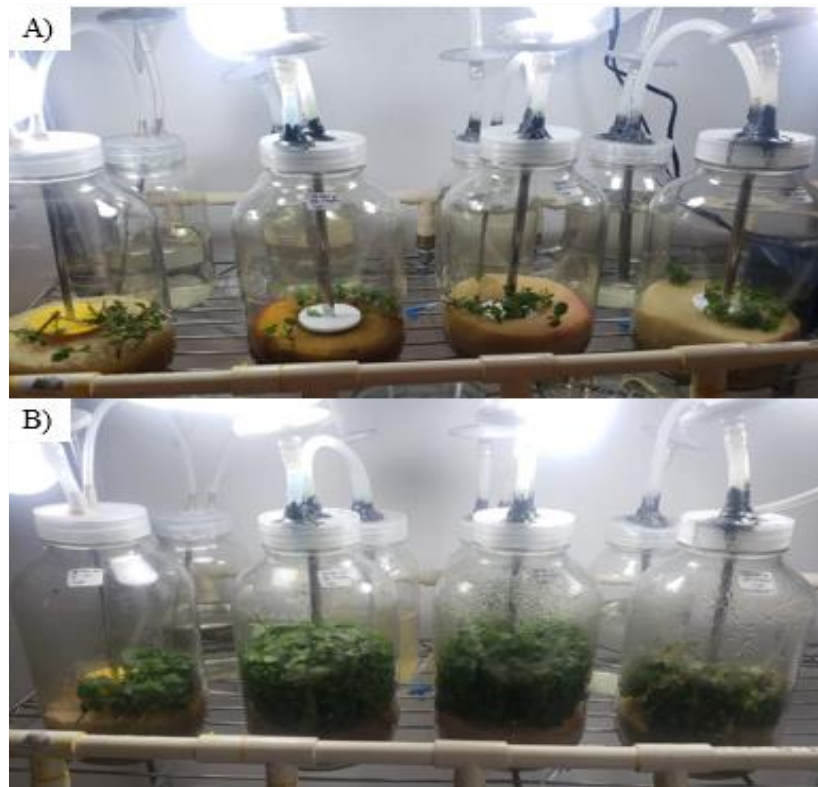


Figura 15. Evaluación inicial y final del efecto de la citoquinina BAP. A) Sistemas de inmersión temporal en su evaluación inicial. B) Sistemas de inmersión temporal en su evaluación después de 6 semanas de incubación.

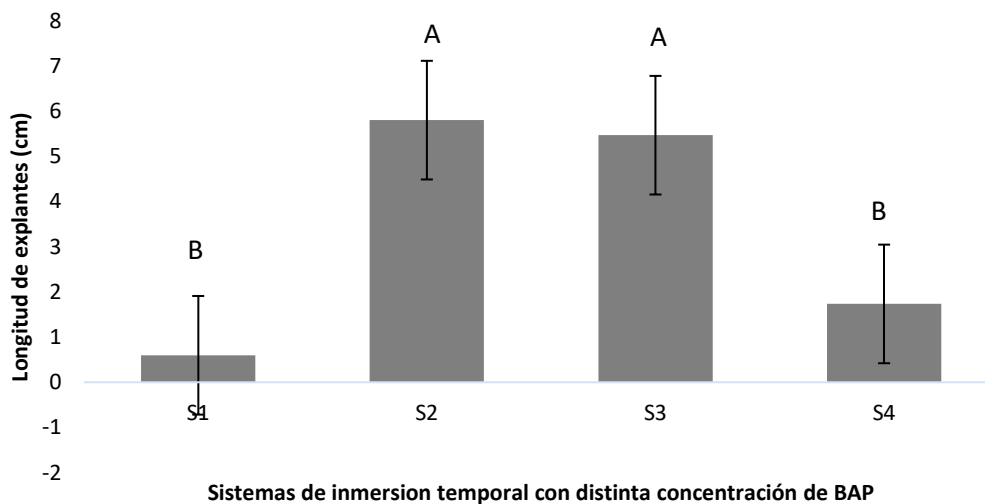


Figura 16. Evaluación del incremento en la longitud de explantes a diferentes concentraciones de BAP en un sistema de inmersión temporal con medio MS al 100% de sales y 2 mL L<sup>-1</sup> en todos los sistemas. S1: sin BAP, S2: con 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, S3: con 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP, S4: con 3 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Letras diferentes indican significancia estadística (Tukey, p ≤ 0.05) entre columnas.

En la figura 16, puede apreciarse como el sistema 2 y 3, los cuales presentan una concentración de 1 y 2 mg·L<sup>-1</sup> de BAP, a través de un análisis de varianza y una prueba

de comparación de medias Tukey son iguales, además presentan la media más alta, sin embargo, se tiene una diferencia significativa con respecto al sistema 1 y 4

En el incremento promedio de la cantidad de nudos e obtuvieron los siguientes resultados (Figura 17), tras seis semanas de incubación en los sistemas de inmersión temporal con diferentes concentraciones de BAP, el S<sub>1</sub> con 1.16 nudos, mientras que en el S<sub>2</sub> con 2, el S<sub>3</sub> 2.71 nudos, y finalmente el S<sub>4</sub> con 0.46.

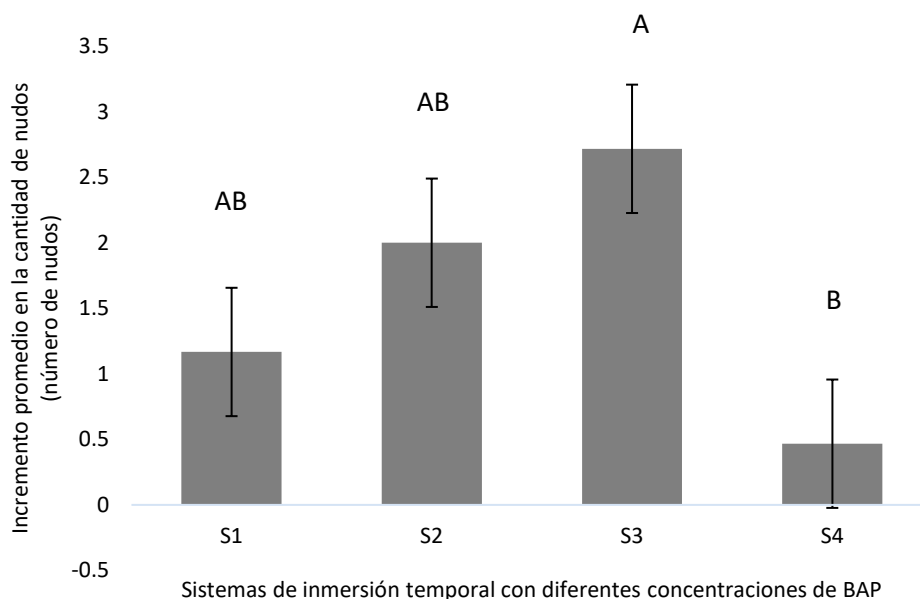


Figura 17. Evaluación del incremento promedio en la cantidad de nudos en explantes, a diferentes concentraciones de BAP en un sistema de inmersión temporal con medio MS al 100% de sales y 2 mL L<sup>-1</sup> PPM en todos los sistemas. S1: sin BAP, S2: con 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, S3: con 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP, S4: con 3 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Letras diferentes indican significancia estadística (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) entre columnas.

En la evaluación del incremento promedio de la cantidad de nudos (Figura 17), el sistema 3 presentó una media mayor, sin embargo, comparte letra con el sistema 1 y 2, por lo que solo resulta ser significativamente diferente al sistema 4.

Se realizó un análisis del incremento en el número de hojas (Figura 18), tras seis semanas de incubación y se obtuvo en el S<sub>1</sub> 3.91 hojas, por otro lado, el S<sub>2</sub> 5.13, mientras que el S<sub>3</sub> 3.2, y finalmente el S<sub>4</sub> con 0.23 hojas.



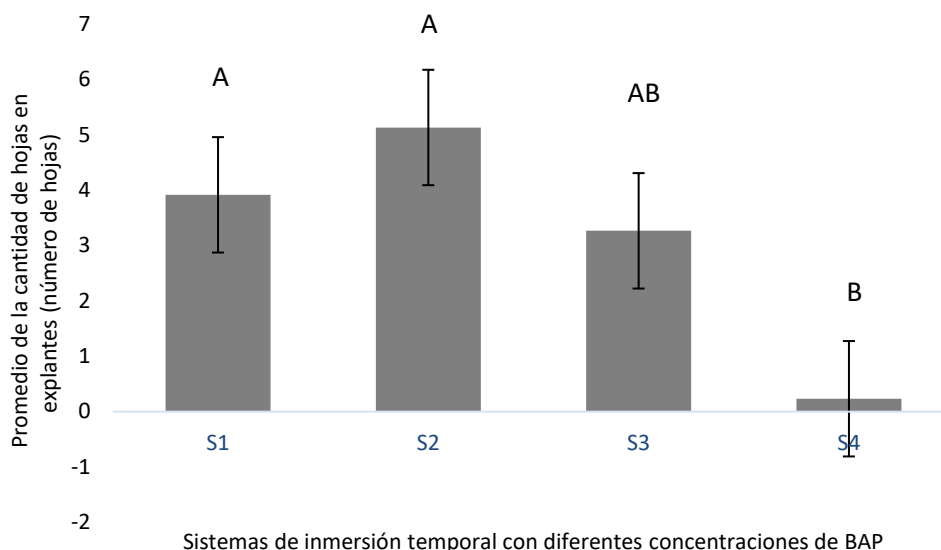


Figura 18. Evaluación del incremento promedio en la cantidad de hojas en explantes, a diferentes concentraciones de BAP en un sistema de inmersión temporal con medio MS al 100% de sales y 2 mL<sup>-1</sup> PPM en todos los sistemas. S1: sin BAP, S2: con 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, S3: con 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP, S4: con 3 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Letras diferentes indican significancia estadística (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) entre columnas.

Se puede ver que al aplicar el correspondiente análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey con un 95% de confianza, el sistema 1 y 2 que tienen una concentración de 0 y 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, presentan una diferencia significativa con respecto al sistema 4, mientras que con el sistema 3 comparte una letra. Se observa que a medida que aumenta la cantidad de BAP en el sistema 3 y 4, con concentración de 2 y 3 mg L<sup>-1</sup>, el número de hojas disminuye.

Finalmente se analizó el incremento del número de brotes por explante, para los cuatro sistemas de inmersión temporal con distinta concentración de BAP (Figura 19), obteniéndose en el S<sub>1</sub> 0.56 brotes, para el S<sub>2</sub> 16.33, mientras que en el S<sub>3</sub> 41.66 y finalmente 12.66 brotes para el S<sub>4</sub>.

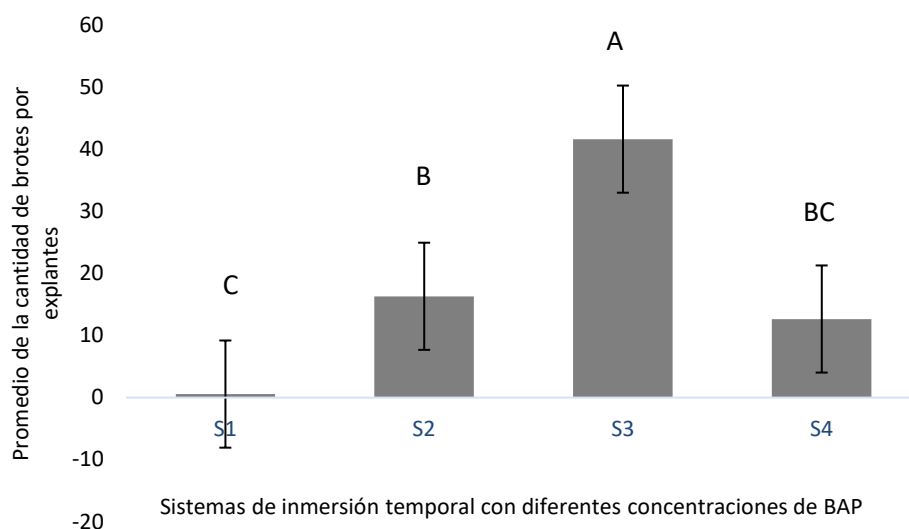


Figura 19. Evaluación del incremento promedio en la cantidad de brotes en explantes, a diferentes concentraciones de BAP en un sistema de inmersión temporal con medio MS al 100% de sales y 2 mL L<sup>-1</sup> PPM en todos los sistemas. S1: sin BAP, S2: con 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, S3: con 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP, S4: con 3 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Letras diferentes indican significancia estadística (Tukey, p≤0.05) entre columnas.

De acuerdo con el análisis de varianza y la prueba de comparación de medias Tukey correspondiente, se puede notar como el sistema 3, presenta diferencia significativa con respecto al resto de sistemas, por lo que en este ensayo preliminar la concentración de 2 mg·L<sup>-1</sup> (S3) es la más adecuada, ya que produce un mayor incremento en el número de brotes. Sin embargo, también el volumen de callo aumento en esta concentración (Figura 20).

Cuadro 4. Efecto de la citoquinina BAP en la organogénesis de los explantes de zarzamora. Medias con letras diferentes en una misma columna indican significancia estadística (Tukey, p≤0.05) entre columnas.

Sistemas	Longitud de explantes cm	Número de nudos	Número de hojas	Número de brotes
S1 (sin BAP)	0.59 B	1.16 AB	3.91 A	0.56 C
S2 (1 mg·L <sup>-1</sup> BAP)	5.8 A	2 AB	5.13 A	16.33 B
S3 (2 mg·L <sup>-1</sup> BAP)	5.46 A	2.71 A	3.26 AB	41.66 A
S4 (3 mg·L <sup>-1</sup> BAP)	1.73 B	0.46 B	0.26 B	12.66 BC

A través del cuadro 4, se puede observar como el sistema 2 y el sistema 3, son aquellos presentan diferencias significativas y una media más alta en las cuatro evaluaciones, en el caso de la longitud de explantes y el número de hojas, el sistema 2 con 1 mg L<sup>-1</sup> de

BAP tuvo la mayor y mejor media, mientras que en cuanto al número de nudos y de brotes el sistema 3 ( $2 \text{ mg L}^{-1}$  BAP) fue el mejor. En cuanto a micropropagación uno de los factores más importantes es la producción de brotes, por lo que se podría considerar el sistema 3 como el mejor tratamiento, ya que la cantidad de brotes es mayor (Figura 22, inciso A) que el sistema 2, sin embargo, el desarrollo de callo en el sistema 3 fue bastante (Figura 20, inciso B), en comparación con el sistema 2, por lo que finalmente se optó por tomar la concentración de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  como la mejor opción para la micropropagación de zarzamora a través de un sistema de inmersión temporal.



Figura 20. Desarrollo de callo en el sistema 3. A) Planta del  $S_3$  ( $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP) con presencia de callo, B) Parte del callo proveniente del  $S_3$  con  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP.

De acuerdo con Gutiérrez y González (2019), no es conveniente tener gran presencia de callo en la base de los explantes, debido a que se dificulta bastante la asimilación de nutrientes por parte de los mismos, ya que la división celular para la formación del callo demanda gran parte de la energía, además de que este tipo de célula al no estar especializada su división es mucho más rápida. Por otro lado, mencionan que otra de las problemáticas graves es que, al regenerar un individuo completo, que es lo que se busca básicamente al hacer una micropropagación por organogénesis, se puede tener una alta variabilidad, ya que la uniformidad a nivel genético no se puede asegurar, y esto no es realmente lo que se busca en muchos casos.

### 3.8 Evaluación comparativa entre planta en medio de cultivo semisólido y en un sistema de inmersión temporal bajo dos concentraciones de BAP

Se realizó una comparación entre planta sembrada en medio de cultivo convencional semisólido con 0 y 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP (T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>), además de planta tratada bajo un sistema de inmersión temporal con 0 y 1 mg·L<sup>-1</sup> de BAP (S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub>), en ambos casos se evaluó a las seis semanas de sembradas, se mantuvieron bajo mismas condiciones de incubación como temperatura y luz. El medio de cultivo presentaba el mismo porcentaje de sales MS (100%), misma concentración de bactericida PPM (2 mL L<sup>-1</sup>), así como también en el caso del medio semisólido se agregó agar como gelificante. Tras evaluar la longitud de explantes en cm, el número de nudos, hojas y brotes, se presentan los siguientes resultados.

En cuanto al incremento de la longitud en cm, se tiene el T<sub>1</sub> con 1.94 cm, T<sub>2</sub> con 2.37, el S<sub>1</sub> 7.68 y finalmente el S<sub>2</sub> 2.40 cm (Figura 21).

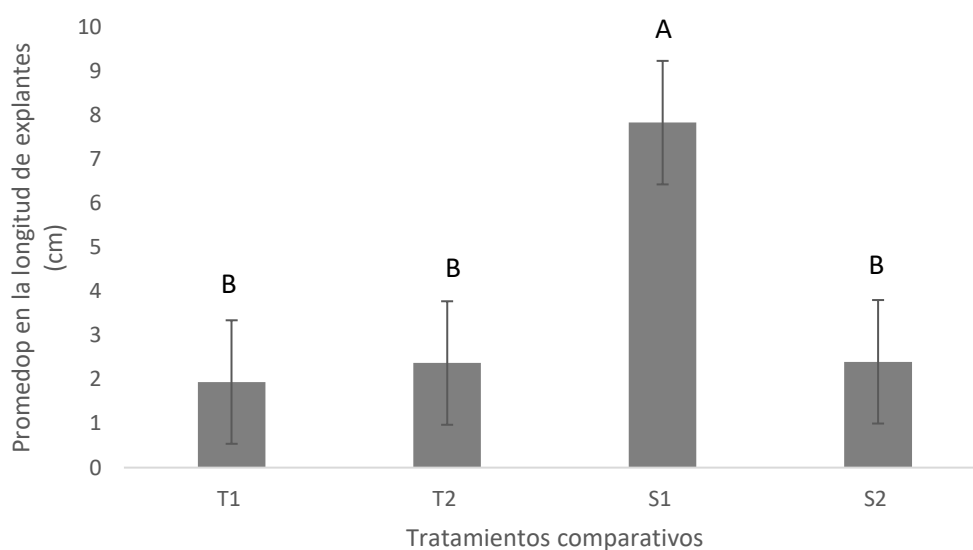


Figura 21. Evaluación comparativa entre medio semisólido y un sistema de inmersión temporal en el incremento promedio de longitud en cm. T<sub>1</sub>: Medio de cultivo semisólido MS al 100% de sales adicionado con 2 mL L<sup>-1</sup> de PPM sin BAP, T<sub>2</sub>: Medio de cultivo semisólido MS al 100% de sales adicionado con 2 mL L<sup>-1</sup> de PPM con 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, S<sub>1</sub>: Medio de cultivo MS al 100% de sales adicionado con 2 mL L<sup>-1</sup> de PPM con 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP en un sistema de inmersión temporal, S<sub>2</sub>: Medio de cultivo MS basal al 100% de sales adicionado con 2 mL L<sup>-1</sup> de PPM con 0 mg L<sup>-1</sup> de BAP en un sistema de inmersión temporal. Letras diferentes indican significancia estadística (Tukey, p≤0.05) entre columnas.

Por medio de un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias Tukey (p ≤0.05) se revisaron los resultados de los tratamientos en los que se puede notar como el

S<sub>1</sub> que es el del sistema de inmersión temporal con 1 mg·L<sup>-1</sup> de BAP es el único que presenta diferencias significativas con respecto a los otros tres tratamientos, además de poseer una media más alta (Figura 21).

En la figura 22 se presentan los resultados obtenidos en la evaluación del número de nudos, el número de hojas y el de brotes, en el cual se comparó dos tratamientos en medio semisólido, uno sin BAP y otro con una concentración de 1 mg L<sup>-1</sup>, y dos tratamientos en sistema de inmersión temporal uno sin BAP y otro con 1 mg L<sup>-1</sup>, y por medio de un análisis de varianza y una prueba Tukey (p≤0.05), se puede observar como en el caso del número de nudos el S<sub>1</sub> presenta diferencia significativa y una media mayor, al igual que en el número de hojas y brotes.

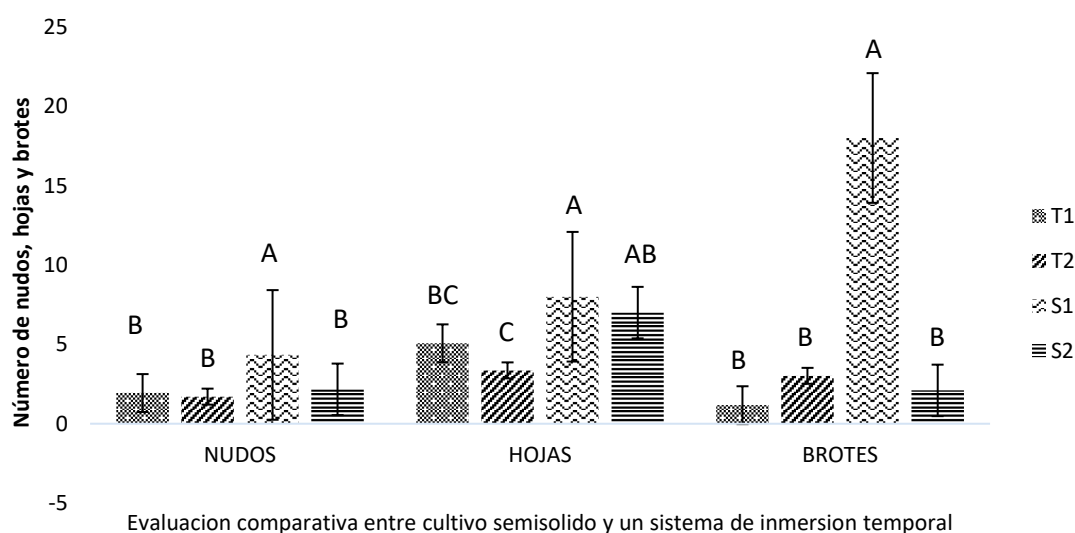


Figura 22. Evaluación comparativa entre medio semisólido y un sistema de inmersión temporal en el incremento del número de nudos, hojas y brotes. T1: Medio de cultivo semisólido MS al 100% de sales adicionado con 2 mL L<sup>-1</sup> de PPM sin BAP, T2: Medio de cultivo semisólido MS al 100% de sales adicionado con 2 mL L<sup>-1</sup> de PPM con 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, S1: Medio de cultivo MS al 100% de sales adicionado con 2 mL L<sup>-1</sup> de PPM con 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP en un sistema de inmersión temporal, S2: Medio de cultivo MS basal al 100% de sales adicionado con 2 mL L<sup>-1</sup> de PPM con 0 mg L<sup>-1</sup> de BAP en un sistema de inmersión temporal. Letras diferentes indican significancia estadística (Tukey, p≤0.05) entre columnas.

De acuerdo con García *et al.* (2020). la planta presenta un mejor desarrollo y multiplicación en un sistema de inmersión temporal, debido a que estos permiten una renovación frecuente de los gases que se encuentran al interior de los frascos, lo que evita la acumulación de etileno, el cual provoca el envejecimiento de los tejidos. Cosa que no sucede en un medio semisólido.

Por otro lado, Castillo *et al.* en el 2020, mencionaron que otra de las ventajas de los sistemas de inmersión temporal es que al estar en contacto de manera intermitente con el medio de cultivo no solo evita la vitrificación, sino que también ayuda al desarrollo y crecimiento de los explantes, esto debido a que toda la superficie del explante se encuentra en contacto con el medio de cultivo, por lo que puede absorber mejor los nutrientes, mientras que en el cultivo convencional con medio de cultivo semisólido, solamente la base es la que está en contacto con el medio de cultivo.

#### IV. CONCLUSIONES

Tras realizar las pruebas anteriores, se tiene para el número de inmersiones 6 inmersiones por día de 5 minutos cada una, en la etapa inicial de la planta y posteriormente conforme crece y aumenta el número y tamaño de hojas se baja a 5 y a 4 inmersiones al día.

El utilizar ppm 2 mL L<sup>-1</sup> de medio de cultivo, y sellar los sistemas de inmersión temporal con plastiaceró, logra evitar la contaminación hasta por 15 semanas.

Para la concentración del medio de cultivo en plantas de zarzamora variedad Tupy, resulta adecuado el MS al 75% de sales, con el cual se logra el mismo crecimiento que con el de 100% y se ahorran recursos.

Una concentración de 1 mg L<sup>-1</sup> citoquinina 6-benzilaminopurina, resulta efectiva para la propagación de brotes de zarzamora variedad Tupy, sin llegar a una sobreproducción de callo embriogénico, que en este caso no es deseable.

El uso de un sistema de inmersión temporal en explantes de zarzamora variedad Tupy presenta un incremento en el número de hojas, brotes, nudos e incluso en longitud de explantes, con respecto a un medio de cultivo semisólido convencional.

## **V. RECOMENDACIONES**

- Realizar pruebas con otros reguladores de crecimiento para hacer comparaciones con la citoquinina 6-benzilaminopurina, o combinaciones entre auxinas y citoquininas para evaluar su efecto.
- Evaluar la etapa de aclimatación con distintos sustratos.
- Utilizar otros medios de cultivo, adicionales al Murashige y Skoog, para realizar comparaciones.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, G., Baudoin J. P. y Leigue, L. (2016). Aplicación de cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos. Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias. 240 p. ISBN 9789942787989. [En línea]: Disponible en: <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/212904/1/Aguirre%2C%20Baudoin%2C%20Leigue%20UMSS%202016.pdf>
- Alcántara, J. S., Acero, J., Alcántara J. D. y Sánchez R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. NOVA. 17 (32): 108-129. [En línea]: Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-109.pdf> (Acceso noviembre 8, 2020).
- Alvarenga S. y Salazar T. (2015). Micropropagación masiva de *Stevia rebaudiana* Bertoni en sistemas de inmersión temporal. Cultivos Tropicales, 36(3), 50-57.
- Aneberries (2016). Desarrollo y oportunidades en la producción de berries. Revista Horticultivos. 08-10, [En línea]: Disponible en: <https://hrti.co/revista/2016/agosto/revista/#page/8/mode/2up>
- Arredondo, C. A. (2019). Master. Tesis. Diseño y automatización de un nuevo biorreactor para sistemas de inmersión temporal. Universidad Autónoma del Estado de México. Texcoco, Estado de México, México. 100 pp. [En línea]: Disponible en: <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/98805/Clara%20Anabel%20Arredondo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ávila, D. A. (2018). Tesis. Estandarización del sistema de inmersión temporal para la micropropagación *in vitro* de (*Cattleya schroederae*). Universidad de Santander. Bucaramanga, Santander, Colombia. 55 pp. [En línea]: Disponible en: <https://repositorio.udes.edu.co/bitstream/001/1049/1/Estandarizaci%C3%B3n%20del%20sistema%20de%20inmersi%C3%B3n%20temporal%20para%20la%20micropropagaci%C3%B3n%20in%20vitro%20de%20cattleya%20schroederae..pdf>. (Acceso Enero 30, 2020).
- Ayub, R. A., Santos, J. N. D., Zanolensi Junior, L. A., Silva, D. M. D., Carvalho, T. C. D. y Grimaldi, F. (2019). Sucrose concentration and volume of liquid medium

- on the *in vitro* growth and development of blackberry cv. Tupy in temporary immersion systems. *Ciencia e Agrotecnología*, 43. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2313-29572020000400338&script=sci\\_arttext&tlng=en#B2](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2313-29572020000400338&script=sci_arttext&tlng=en#B2)
- Bedoya, J., Jaramillo, C., Gómez, S. y Restrepo, S. (2016). Estandarización de un protocolo de desinfección y establecimiento de cultivo *in vitro* de *Aloysia tryphilla*. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 14. 38. 10.18684/BSAA(14)38-46 [En línea]: Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/307948685\\_ESTANDARIZACION\\_DE\\_UN\\_PROTOCOLO\\_DE\\_DESINFECCION\\_Y\\_ESTABLECIMIENTO\\_DE\\_CULTIVO\\_In\\_vitro\\_DE\\_Aloysia\\_tryphilla](https://www.researchgate.net/publication/307948685_ESTANDARIZACION_DE_UN_PROTOCOLO_DE_DESINFECCION_Y_ESTABLECIMIENTO_DE_CULTIVO_In_vitro_DE_Aloysia_tryphilla) (Acceso Julio 29, 2022).
- Bahi Arevich, M. y Pérez Pérez, J. (2020). Multiplicación de brotes de morera variedad Doña Betty en Sistema de Inmersión Temporal (Original). *Redel. Revista Granmense De Desarrollo Local*, 5(1): 64-73. Recuperado a partir de <https://revistas.udg.co.cu/index.php/redel/article/view/2157>
- Bello, J. J., Spinoso, J. y Iglesias, L. G. (2018). Establecimiento de un Sistema de Biorreactores para la Micropropagación de Vainilla (*Vanilla planifolia Jacks. ex Andrews*). *Agro Productividad*. [En línea]: Disponible en: <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/526/406>. <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v60n4/v60n4a07.pdf> (Acceso octubre 5, 2020).
- Bello, J. J., Martínez, E., Morales, V. y Camal, H. (2017). Comparación de tres sistemas de biorreactores para la micropropagación comercial de caña de azúcar. *Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Veracruz, México*. 1-7 pp. [En línea]: Disponible en: <https://www.atamexico.com.mx/wp-content/uploads/2017/11/1.-VARIEDADES-1.pdf> (Acceso marzo 10, 2021).
- Boyzo, J. (2014). Master, Tesis. Etiología y manejo sustentable de cánceres en ramas de la zarzamora. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional. Jiquilpan, Michoacán. México. 3 pp. [En línea]: Disponible en: <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/16851/BOYZO%20MARIN%20JUAN%20-%20B120940.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Acceso julio 02, 2021).

- Calderón, G. (2006). Producción forzada de Zorzamora en México. III Simpósio nacional do morango II Encontro sobre pequenas frutas e Frutas nativas do Mercosur, 67 pp.
- Castillo, A., Ashfield, R., Bentancor, M., Bentancour, L., Bonilla, M. B., Ceppa, M., Franco, R., Silva, N., Cabrera, D., Rodríguez, P. y Zoppolo, R. (2019). Micropropagación de plantas en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT). Revista INIA, Biotecnología. 56: 88-91. [En línea]: Disponible en: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/12606/1/Revista-INIA-56-biotec.pdf> (Acceso octubre 15, 2020).
- Castillo, A. L., Moreno, A. y García, R. M. (2020). Eficiencia del sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional *in vitro*. Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas, 3(2): 173- 182. [En línea]: Disponible en: <https://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA/article/view/284> (Acceso Agosto 2, 2022).
- Cedrés, M., Sharry, S., Adema, M. y Abedini, W. (2015). Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Edulp. 1ª edición. 233 p. ISBN 978-950-34-1254-1. [En línea]: Disponible en: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento\\_completo\\_.pdf-PDFA.pdf?sequence=1](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento_completo_.pdf-PDFA.pdf?sequence=1). (Acceso octubre 11, 2020).
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) (1993). Capítulo 7. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. pp. 143. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Roca, W., Mroginski, L. A editores. Cali, Colombia. ISBN 958-9183-15-8 T.
- Colmenares, M. y Jiménez, C. (2003). Multiplicación *in vitro* de *Musa* spp. Mediante sistema de inmersión temporal. Revista de la Facultad de Agronomía, 20(4): 468-477.
- Contreras, F. (2016). Master. Tesis. Desarrollo de métodos de propagación *in vitro* del alcaparro (*Capparis* spp.). Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, Aguascalientes, México. 109 pp. [En línea]: Disponible en: <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/11317/1194/416122.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. (Acceso octubre 15, 2020).
- Contreras, M., Santoyo, G., Santos, S., Gutiérrez M., Orozco M., y Rocha M. (2019). Primer reporte de *Lasiodiplodia* en plantas de zorzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*) en el estado de Michoacán, México. Rev. Mex. Fitopatol [En línea].

Vol.37, No.3: 479-485. Epub 30-Sep-2020. ISSN 2007-8080. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1905-4>.

- Cossio, L., y Marassi M. (2013). Reguladores de crecimiento. Catedra de fisiología vegetal. Universidad Nacional del Nordeste Facultad de Ciencias Exactas y Agrimensura. [En línea]: Disponible en: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Guiadeestudio-reguladoresdecrecimiento.pdf> (Acceso noviembre 15, 2020).
- Delfino, P., Rivata, R. y Bima, P. (2020). Sistema de inmersión temporal (sit): alta eficiencia en la propagación *in vitro* del portainjerto híbrido *Prunuspersica x p. amygdalus*. Nexo Agropecuario, Volumen 8, Número 1. [En línea]: Disponible en <file:///C:/Users/Adriana%20Ruiz/Downloads/ctabarez,+3+8+sistema+28790-Texto+del+art%C3%ADculo-90895-1-10-20200621.pdf> (Acceso Julio 15, 2022).
- FIA. (2009). Resultados y lecciones en sistemas de inmersión temporal en especies anuales, frutales, y vides, serie: Experiencias de Innovación para el Emprendimiento Agrario. Fundación para la Innovación Agraria-Documentos. [En línea]: Disponible en: [https://www.opia.cl/static/website/601/articles-75552\\_archivo\\_01.pdf](https://www.opia.cl/static/website/601/articles-75552_archivo_01.pdf) (Acceso octubre 3, 2020).
- Flórez, J. (2016). Proyecto: NWF Network del programa ERASMUS: Iniciativa transnacional para el impulso de las competencias y mentalidades empresariales en el sector forestal no maderero. Guía práctica de gestión y manejo de productos forestales no maderables. Ayuntamiento de Cuadros. [En línea]: Disponible en: [https://epale.ec.europa.eu/sites/default/files/guia\\_nwf1.pdf](https://epale.ec.europa.eu/sites/default/files/guia_nwf1.pdf) (Acceso octubre 11, 2020).
- Freire, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Biotecnología vegetal Vol. 3 N 4. 195-209 pp. [En línea]: Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/viewFile/263/237#:~:text=Para%20inducir%20la%20formaci%C3%B3n%20del,se%20trabaja%20con%20plantas%20monocotiled%C3%B3neas>. (Acceso Enero 4, 2020).
- Galleta, G. y Violette, C. (1989). The Brambles. pp: 3 – 8. In: Brambles production guide. M Pritts, D. Handley (eds). Northeast Regional Agricultural Engineering Service. Ithaca, New York, E.U.

- Gamarra, L. (2014). Tesis. Regeneración *in vitro* vía organogénesis y aislamiento de protoplastos de *Gmelina arborea* a partir de plantas *in vitro*. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. 109 pp.
- García, J., González M., Freire M., Roque, B., Hurtado, O. y Mena, E. (2013). Efecto de la frecuencia de inmersión sobre la multiplicación de brotes de *Bambusa vulgaris Schrader ex Wendland* en SIT RITA. Biotecnología vegetal. 13:2. [En línea]: Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/108/469>. (Acceso Julio 3, 2021).
- García, R. M., Castillo, A. L. y Moreno, A. (2020). Características y uso del sistema de inmersión temporal en la propagación *in vitro* en la familia *Bromeliaceae*. Revista Científica Agroecosistemas, 8(1): 64-67 [En línea]: Disponible en: <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/view/384> (Acceso Agosto 2, 2020).
- Gisbert, D. C. (2010). Morfogénesis: la ruta organogénica versus la ruta embriogénica. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Biotecnología. [En línea]: Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/11526/Microsoft%20Word%20-%20art%EDculo%20docente%20cgisbert%20sept2010.pdf?sequence=1#:~:text=En%20la%20organog%C3%A9nesis%20se%20produce,a%20partir%20de%20c%C3%A9lulas%20som%C3%A1ticas>. (Acceso enero 3, 2020).
- Gutiérrez, A. y González, B. (2019). Reguladores de crecimiento en el cultivo *in vitro* de tres cultivares portainjertos de vid (*Vitis vinifera* L.) para su uso en la industria del pisco. *Scientia Agropecuaria*, 10(4), 461-468. [En línea]: Disponible en: <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.04.02>. (Acceso agosto 02, 2022).
- Huh, Y. S., Lee, J. K., Kim, I. J., Kang, B. G. y Lee, K. Y. (2015). Effect of biocide addition on plantlet growth and contamination occurrence during the *in vitro* culture of blueberry. *Journal of Plant Biotechnology*. The Korean Society for Plant Biotechnology. <https://doi.org/10.5010/jpb.2015.42.2.111>. (Acceso Julio 15, 2022).
- Hurtado, D. V., y Merino, M. E. 1987. (reimp.2014). Capítulo 5. Medio de Cultivo. pp 67. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas. México D.F., México. ISBN 978-968-24-2159-4

- Lambardi, M., Ozudogru, E. A., y Jain, S. M. (2013). Chapter 11. Micropropagation of *Rubus* and *Ribes spp.* pp 151. Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants. Humana Press. New York, USA. ISSN 1940-6029 (electronic). DOI 10.1007/978-1-62703-074-8.
- Lencina, K. H., Bisognin, D. A., Kielse, P., Pimentel, N. (2017). Enraizamiento y aclimatación de plántulas de *Apuleia leiocarpa*. Agrocienca. [En línea]: Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952017000800909&lng=es&nrm=iso&tlng=es#:~:text=La%20aclimataci%C3%B3n%20es%20esencial%20para,modificar%20gradualmente%20y%20con%20precauci%C3%B3n](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952017000800909&lng=es&nrm=iso&tlng=es#:~:text=La%20aclimataci%C3%B3n%20es%20esencial%20para,modificar%20gradualmente%20y%20con%20precauci%C3%B3n) (Acceso octubre 20, 2020).
- López M., J. (2009). Producción forzada de frutillas en México. pp: 15 – 20. In: II Simposium Nacional de Producción Forzada de Frutales y I Curso de Producción Forzada en Frutillas y Durazno. Programa de Fruticultura. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Texcoco, México.
- Lugo, O., Arellano, G. y Hernández D. (2017). Automatización de un sistema de inmersión temporal con base en plataformas abiertas de hardware y software. Terra Latinoamericana. [En línea]: Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-57792017000300269](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792017000300269). ISSN 2395-8030. <https://doi.org/10.28940/terra.v35i3.193> (Acceso noviembre 5, 2020).
- Mancilla, E., Pérez, J. A., Núñez, R., Spinoso, J. L. y Bello, J. J. (2021). Comparison of different semi-automated bioreactors for *In vitro* propagation of taro (*Colocasia esculenta L. Schott*) Plants 2021, 10, 1010. <https://doi.org/10.3390/plants10051010> En línea]: Disponible en: <https://www.mdpi.com/2223-7747/10/5/1010/htm> (Acceso Julio 15, 2022).
- Martín, R., Chong, B., y Pérez, N. (2015). Organogénesis *in vitro* en el género *Digitalis*. Biotecnología vegetal Vol. 15. N 4. pp 195-206. [En línea]: Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/497/html> (Acceso Enero 3, 2020).
- Monasterio, E. (1992). Doctoral. Tesis. Revisión taxonómica del género *Rubus L.* (Rosaceae) en la Península Ibérica e islas Baleares. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de farmacia, departamento de Biología Vegetal (Botánica). Madrid, España. 47 p. [En línea]: Disponible en:

- <http://webs.ucm.es/BUCM/tesis/19911996/D/1/AD1005201.pdf> (Acceso Julio 2, 2021)
- Muñoz, M. y Juárez, M. D. R. (1997). El mercado de los frutos menores: el caso de la frambuesa y zarzamora. Universidad Autónoma Chapingo. 110 p.
- Navarrete, M. E. (2019). Tesis. Multiplicación *in vitro* de *Aristotelia chilensis* en sistema de inmersión temporal SETIS. Universidad de Talca de Chile. Facultad de ciencias Agrarias. Talca, Chile. 24 p. [En línea]: Disponible en <http://dspace.otalca.cl/bitstream/1950/11974/5/20190084.pdf> (Acceso 15 Julio, 2022)
- Nikoloff, N. (2015). No siempre sale todo bien... Problemas de cultivos de tejidos vegetales. S. Sharry, M. Adema y W. Abendi (Eds.), *Plantas de Probeta*. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejido *in vitro* (104 pp.) Editorial de la Universidad de la Plata. [En línea]: Disponible en <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/book/407> (Acceso 15 Julio, 2022)
- Orozco, R., Flores, D. y Arguello F. (2011). Efecto de diferentes tipos de propagación en el rendimiento de mora Vino (*Rubus adenotrichus*). Agron. Mesoam. Vol.22, No. 1: 91-97. ISSN 2215-3608. [En línea]: Disponible en: [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1659-13212011000100011](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212011000100011) (Acceso Abril 7, 2022)
- Oviedo, D., Alvarenga, S., Evangelista, S., Sepúlveda, G. y Rodríguez, M. (2015). Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un cultivo promisorio para México. BioTecnología Vol. 19, N° 2, 14-27 pp [En línea]: Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/302959553\\_Micropropagacion\\_de\\_Stevia\\_rebaudiana\\_Bertoni\\_un\\_Cultivo\\_Promisorio\\_para\\_Mexico](https://www.researchgate.net/publication/302959553_Micropropagacion_de_Stevia_rebaudiana_Bertoni_un_Cultivo_Promisorio_para_Mexico) (Acceso Enero 27, 2020).
- Prieto, H., Jordan, M., Barrueto, L. P., Cordeiro, M. C. y Durzan, D.J. (2005). Capítulo 2. El cultivo de tejidos. Pp 31 Biotecnología Vegetal. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Santiago, Chile. ISBN: 956-7016-23-2.
- Raya, Y. A., Carrillo, G., Pedraza, M. E., Corona, T., Carrillo, J. A. y Alcantar, G. (2011). Propagación *in vitro* de *Laelia halbingeriana*. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 2(spe3), 539-553. [En línea]: Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342011000900011&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342011000900011&lng=es&tlng=es). (Acceso Agosto 02, 2020).

- Ricárdez, G., Aguilar, N., Galindo, M. E. y Debernardi, T.J. (2016). Diagnóstico de la producción de Zarzamora (*Rubus sp.*) en la zona centro de Veracruz, México. Agroproductividad. [En línea]: Disponible en:<http://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/768/634> (Acceso octubre 3, 2020).
- Rieger, M. (2006). Blackberries and raspberries (*Rubus spp.*). Introduction to fruit crop. University of Georgia. pp: 89-103.
- Rocano, M.N., Villena, P.G., y Peña D. F. (2017). Evaluación de los sistemas de cultivo semisólido y BIT en la multiplicación *in vitro* de *Juglans neotrópica*. Maskana, v.8, n. 1. Cuenca, Ecuador. 103-109 pp. DOI: <https://doi.org/10.18537/mskn.08.01.09> [En línea]: Disponible en: [https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/1192/pdf\\_1](https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/1192/pdf_1) (Acceso marzo 7, 2020).
- Rosales, E., Rodríguez, L. E., Alvarado, O., y Cardenas, M. E. (2003). Diseño y construcción de un sistema de inmersión temporal. Centro agrícola, n.1. Nuevo León, México y Holguín, Cuba. 69-72 pp. [En línea]: Disponible en: [http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V30-Numero\\_1/cag161031276.pdf](http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V30-Numero_1/cag161031276.pdf)
- Rueda, M. (2017). Master. Tesis. Caracterización morfológica, fisicoquímica y niveles de ploidía en zarzamoras (*Rubus* subgénero *Eubatus*) silvestres de Michoacán. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan, Michoacán. México. 5 pp. [En línea]: Disponible en: [http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB\\_UMICH/2067/FAPJ-M-2017-0495.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB_UMICH/2067/FAPJ-M-2017-0495.pdf?sequence=1&isAllowed=y) (Acceso Abril 6, 2022)
- Rueda, C. (2019). Tesis. Actualización de los conceptos asociados con la regeneración celular en plantas. Universidad de Santander. Bucaramanga, Santander. Colombia. 15 pp. [En línea]: Disponible en: <https://repositorio.udes.edu.co/bitstream/001/1063/1/Actualizaci%C3%B3n%20de%20los%20conceptos%20asociados%20con%20la%20regeneraci%C3%B3n%20celular%20en%20plantas.pdf> (Acceso Julio 8, 2022)
- SEDRUA. (Secretaría de Desarrollo Rural y Agroalimentario) (2017). Michoacán Líder Nacional en producción de Berries. Secretaria de Desarrollo Rural y Agroalimentario. [En línea]: Disponible en:



- <http://sedrua.michoacan.gob.mx/michoacan-lider-nacional-en-produccion-de-berries-sedrua/> (Acceso octubre 3, 2020).
- SIAP. (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) (2020). México zarzamora 1980-2020. Infosiap. [En línea]: Disponible en: <https://drive.google.com/file/d/1CmkwVfyF8ZvQnWUVGu-eYSfUsM-u7AHv/view> (Acceso Octubre, 2022)
- Sigarroa, A. K., y García, C. L. (2011). Establecimiento y multiplicación *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus Benth.*) variedad sin espinas, mediante ápices meristemáticos. Acta Agronómica. [En línea]: Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v60n4/v60n4a07.pdf> (Acceso Octubre 5, 2020).
- Suárez, I. E. (2020). Capítulo 4. Medios de Cultivo. pp 41. Cultivo de tejidos vegetales. Fondo Editorial Universidad de Cordoba. Cra. 6 No. 77 -305 Montería Colombia. ISBN 978-958-5104-09-9.
- Ugarte, C., Villarroel, C. L., Aguirre G., y State M. (2016). Aplicación de Cultivo de Tejidos en la Multiplicación y Conservación de los Recursos Fitogenéticos. Capítulo 6. Medios de cultivo. Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias. 240 p. ISBN 9789942787989. [En línea]: Disponible en: <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/212904/1/Aguirre%2C%20Baudoin%2C%20Leigue%20UMSS%202016.pdf>. (Acceso noviembre 8, 2020).
- Valdivia, G. (2009). Master. Tesis. Establecimiento de condiciones para transformar plantas de arroz (*Oryza sativa L.*) Morelos A-92 con el gen de la SPS de *Synechocystis*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. México. 117 pp.
- Valdivia, G. (2019). Manual de Propagación *in vitro* de plantas. Laboratorio de Biotecnología. Instituto Tecnológico Superior de Los Reyes.
- Villarroel, C. L. y Cadima, X. (2016). Aplicación de Cultivo de Tejidos en la Multiplicación y Conservación de los Recursos Fitogenéticos. Capítulo 7. Micropropagación de plantas. Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias. 240 p. ISBN 9789942787989. [En línea]: Disponible en: <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/212904/1/Aguirre%2C%20Baudoin%2C%20Leigue%20UMSS%202016.pdf>. (Acceso noviembre 8, 2020).

## ANEXOS

### ANEXO 1

**Cuadro 2 A. Formulaciones de medios de cultivo a lo largo de la historia. Modificado de Soria Durand.**

COMPUESTOS	Knop (1865)	Gauthere t (1942)	Knuds on (1946)	Hildebran dt, Riker y Duggar (1946)
Nitrato de amonio	-	-	-	-
Fosfato de amonio	-	-	-	-
Sulfato de amonio	-	-	500	-
Ácido Bórico	-	0.05	-	3
Cloruro de calcio	500-800	-	-	-
Nitrato de calcio	-	500	1000	800
Fosfato de calcio Tribásico	-	-	-	-
Cloruro de cobalto	-	0.05	-	-
Sulfato cúprico	125-200	0.05	-	-
Sulfato de magnesio	-	125	250	720
Cloruro de manganeso	-	-	-	-
Sulfato de manganeso	-	-	7.5	4.5
Sulfato de manganeso monohidratado	-	3	-	-
Cloruro de potasio	-	-	-	130
Yoduro de potasio	125-200	0.5	-	0.375
Nitrato de potasio	125-200	125	-	160
Fosfato de potasio	-	125	250	-
Sulfato de potasio	-	-	-	-
Molibdato de sodio	-	-	-	-
Nitrato de sodio	-	600	-	-
Fosfato de sodio	-	125	-	132
Sulfato de sodio	-	-	-	100
Sulfato de zinc	-	0.18	-	3
Sulfato férrico	-	-	-	-
Tantrato férrico	-	-	-	5
Sulfato ferroso	-	-	25	-
Ácido etilendiaminotetraacético sal disódica (Na <sub>2</sub> ED)	-	-	-	-
Sulfato de adenina	-	-	-	-
d-biotina	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
Ácido nicotínico	-	-	-	-
Piridoxina	-	-	-	-
Tiamina	-	-	-	-
6(y,y-Dimethylallylamino)purine (2iP)	-	-	-	-
IAA	-	-	-	-
Cinetina	-	-	-	-
Glicina	-	-	-	-
Agar	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-

## ANEXO 1

**Cuadro 2 B. Formulaciones de medios de cultivo a lo largo de la historia.  
Modificado de Soria Durand.**

COMPUESTOS	Vacin & Went (1949)	Hoagland (1950)	Heller (1953)	Murashige (1962)	White (1963)
Nitrato de amonio	-	-	-	1650	-
Fosfato de amonio	-	115	-	-	-
Sulfato de amonio	500	-	125	-	-
Ácido Bórico	-	2.86	1	6.2	1.5
Cloruro de calcio	-	-	75	440	-
Nitrato de calcio	-	945	-	-	300
Fosfato de calcio Tribásico	200	-	-	-	-
Cloruro de cobalto	-	-	-	0.025	-
Sulfato cúprico	-	-	0.03	0.025	-
Sulfato de magnesio	250	250	250	370	720
Cloruro de manganeso	-	1.81	-	-	7
Sulfato de manganeso	7.5	-	0.1	-	-
Sulfato de manganeso monohidratado	-	-	-	16.9	-
Cloruro de potasio	-	-	750	-	6.5
Yoduro de potasio	-	-	0.1	0.83	0.75
Nitrato de potasio	525	607	-	1900	80
Fosfato de potasio	250	-	-	170	-
Sulfato de potasio	-	-	-	-	-
Molibdato de sodio	-	-	-	0.25	-
Nitrato de sodio	-	-	600	-	-
Fosfato de sodio	-	-	125	-	16.5
Sulfato de sodio	-	-	-	-	200
Sulfato de zinc	-	-	1	8.6	3
Sulfato férrico	-	-	50	-	2.5
Tantrato férrico	28	-	-	-	-
Sulfato ferroso	-	5	-	27.8	-
Ácido etilendiaminotetraacético sal disódica (Na <sub>2</sub> ED)	-	-	-	37.3	-
Sulfato de adenina	-	-	-	-	-
d-biotina	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	100	-
Ácido nicotínico	-	-	-	2	0.5
Piridoxina	-	-	-	0.5	0.1
Tiamina	-	-	-	0.4	0.1
6(y,y-Dimethylallylamino)purine (2iP)	-	-	-	-	-
IAA	-	-	-	1.3	-
Cinetina	-	-	-	0.04-10	-
Glicina	-	-	-	-	3
Agar	-	-	-	8000	-
Sacarosa	-	-	-	30000	20000

## ANEXO 1

**Cuadro 2 C. Formulaciones de medios de cultivo a lo largo de la historia.  
Modificado de Soria Durand.**

COMPUESTOS	Morel & Muller (1964)	Linsmaier & Skoog (1965)	Garmborg (B5) (1968)	Nitsch & Nitsch (1969)
Nitrato de amonio	-	1650	-	720
Fosfato de amonio	-	-	-	-
Sulfato de amonio	1000	-	134	-
Ácido Bórico	-	6.2	3	10
Cloruro de calcio	-	400	150	166
Nitrato de calcio	500	-	-	-
Fosfato de calcio Tribásico	-	-	-	-
Cloruro de cobalto	-	0.025	0.025	-
Sulfato cúprico	-	0.025	0.025	0.025
Sulfato de magnesio	125	370	250	185
Cloruro de manganeso	-	-	-	-
Sulfato de manganeso	-	22.3	10	25
Sulfato de manganeso monohidratado	-	-	-	-
Cloruro de potasio	1000	-	-	-
Yoduro de potasio	-	0.33	0.75	-
Nitrato de potasio	-	1900	2500	950
Fosfato de potasio	125	170	0.15	68
Sulfato de potasio	-	-	-	-
Molibdato de sodio	-	0.25	0.25	0.25
Nitrato de sodio	-	-	-	-
Fosfato de sodio	-	-	-	-
Sulfato de sodio	-	-	-	-
Sulfato de zinc	-	8.6	2	10
Sulfato férrico	-	-	27.8	-
Tantrato férrico	-	-	-	-
Sulfato ferroso	-	2.8	-	27.8
Ácido etilendiaminotetraacético sal disódica (Na <sub>2</sub> ED)	-	37.3	37.3	37.3
Sulfato de adenina	-	-	-	-
d-biotina	-	-	-	0.05
Inositol	-	100	100	100
Ácido nicotínico	-	-	1	5
Piridoxina	-	-	1	0.5
Tiamina	-	-	1	0.5
6(y,y-Dimethylallylamino)purine (2iP)	-	-	10	-
IAA	-	1.3	-	0.1
Cinetina	-	0.001-10	-	-
Glicina	-	-	-	2
Agar	-	1000	-	8000
Sacarosa	-	30000	-	30000

## ANEXO 1

**Cuadro 2 D. Formulaciones de medios de cultivo a lo largo de la historia.  
Modificado de Soria Durand.**

COMPUESTOS	Schenk & Hildebrandt (1972)	Gamborg et al (1976)	Anderson (1978)	Lloyd & McCown (1980)
Nitrato de amonio	-	-	400	400
Fosfato de amonio	300	-	-	-
Sulfato de amonio	-	134	-	-
Ácido Bórico	5	3	6.2	6.2
Cloruro de calcio	200	150	440	95
Nitrato de calcio	-	-	-	556
Fosfato de calcio Tribásico	-	-	-	-
Cloruro de cobalto	0.1	0.025	0.025	-
Sulfato cúprico	0.2	0.025	0.025	0.025
Sulfato de magnesio	400	250	370	370
Cloruro de manganeso	-	-	-	-
Sulfato de manganeso	-	10	-	-
Sulfato de manganeso monohidratado	10	-	16.9	22.3
Cloruro de potasio	-	-	-	-
Yoduro de potasio	1	0.75	-	-
Nitrato de potasio	2500	2500	480	-
Fosfato de potasio	-	-	-	170
Sulfato de potasio	-	-	-	990
Molibdato de sodio	0.1	0.25	0.25	0.025
Nitrato de sodio	-	-	-	-
Fosfato de sodio	-	150	380	-
Sulfato de sodio	-	-	-	-
Sulfato de zinc	1	2	8.6	8.6
Sulfato férrico	-	-	-	-
Tantrato férrico	-	-	-	-
Sulfato ferroso	15	27.8	55.7	27.8
Ácido etilendiaminotetraacético sal disódica (Na <sub>2</sub> ED)	20	37.3	74.5	37.3
Sulfato de adenina	-	-	80	-
d-biotina	-	-	-	-
Inositol	1000	100	100	100
Ácido nicotínico	5	1	-	0.5
Piridoxina	0.5	1	-	0.5
Tiamina	5	10	0.4	1
6(y,y-Dimethylallylamino)purine (2iP)	-	-	5	1
IAA	-	-	1	-
Cinetina	-	-	-	-
Glicina	-	-	-	2
Agar	-	-	6000	6000
Sacarosa	-	30000	30000	20000

## ANEXO 2 COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG

En este anexo se muestra la composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), recuperado de Hurtado y Merino (1987)

COMPUESTOS	mg /L
Nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	1650
Nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ )	1900
Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	370
Sulfato de manganeso, monohidrato ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	16.9
Sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	8.6
Sulfato cúprico ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0.025
Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	440
Yoduro de potasio (KI)	0.83
Cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.025
Fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	170
Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	6.2
Molibdato de sodio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.25
Sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	27.8
Ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )	37.3

### ANEXO 3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS EXPERIMENTOS

En este anexo se colocan los resultados de los análisis de varianza y prueba de comparación de medias realizados a cada una de las evaluaciones.

3.1 Análisis de Varianza de la evaluación de diferentes tratamientos de desinfección para el establecimiento de zarzamora variedad Tupy *in vitro*.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTOS	2	7067.5	3533.74	38.59	0.000
Error	6	549.4	91.56		
Total	8	7616.8			

3.1.1 Comparaciones en parejas de Tukey de la evaluación de diferentes tratamientos de desinfección para el establecimiento de zarzamora variedad Tupy *in vitro*.

TRATAMIENTOS	N	Media	Agrupación
3	3	68.15	A
2	3	67.94	A
1	3	8.60	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

3.2 Análisis de Varianza del incremento promedio de la longitud de explantes a diferentes concentraciones de medio MS.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
SISTEMAS	1	0.0250	0.02500	0.02	0.892
Error	8	10.2000	1.27500		
Total	9	10.2250			

3.2.1 Comparaciones en parejas de Tukey y una confianza del 95% del incremento promedio de la longitud de explantes a diferentes concentraciones de medio MS.

SISTEMAS	N	Media	Agrupación
1	5	4.500	A
2	5	4.400	A

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

### 3.3 Análisis de Varianza del Incremento de la longitud de explantes a diferentes concentraciones de BAP.

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
SISTEMA	3	62.003	20.6676	29.85	0.000
Error	8	5.539	0.6924		
Total	11	67.542			

#### 3.3.1 Comparaciones en parejas de Tukey y una confianza de 95% del Incremento de la longitud de explantes a diferentes concentraciones de BAP.

SISTEMA	N	Media	Agrupación
2	3	5.800	A
3	3	5.467	A
4	3	1.733	B
1	3	0.597	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

### 3.4 Análisis de Varianza del Incremento de la cantidad de nudos en explantes a diferentes concentraciones de BAP.

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
SISTEMA	3	8.636	2.8785	4.47	0.040
Error	8	5.155	0.6444		
Total	11	13.791			

#### 3.4.1 Comparaciones en pareja de Tukey y una confianza de 95% del Incremento de la cantidad de nudos en explantes a diferentes concentraciones de BAP.



SISTEMA	N	Media	Agrupación
3	3	2.717	A
2	3	2.000	A B
1	3	1.167	A B
4	3	0.467	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

### 3.5 Análisis de Varianza del Incremento en el número de hojas de explantes a diferentes concentraciones de BAP.

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
SISTEMA	3	39.12	13.041	9.07	0.006
Error	8	11.50	1.438		
Total	11	50.63			

#### 3.5.1 Comparaciones en pareja de Tukey y una confianza de 95% del Incremento en el número de hojas de explantes a diferentes concentraciones de BAP.

SISTEMA	N	Media	Agrupación
2	3	5.133	A
1	3	3.917	A
3	3	3.27	A B
4	3	0.233	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

### 3.6 Análisis de Varianza del Incremento en el número de brotes de explantes a diferentes concentraciones de BAP.

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
SISTEMA	3	2685.3	895.11	34.61	0.000
Error	8	206.9	25.86		
Total	11	2892.2			

#### 3.6.1 Comparaciones en pareja de Tukey y una confianza de 95% en el Incremento del número de brotes de explantes a diferentes concentraciones de BAP.

SISTEMA	N	Media	Agrupación
3	3	41.67	A
2	3	16.33	B
4	3	12.667	B C
1	3	0.567	C

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

3.7 Análisis de Varianza del Incremento de la longitud (cm) en la evaluación comparativa entre medio semisólido y un sistema de inmersión temporal bajo dos concentraciones de BAP.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTOS	3	74.343	24.7809	90.80	0.000
Error	8	2.183	0.2729		
Total	11	76.526			

3.7.1 Comparaciones en pareja de Tukey y una confianza de 95% del Incremento de la longitud (cm) en la evaluación comparativa entre medio semisólido y un sistema de inmersión temporal bajo dos concentraciones de BAP.

TRATAMIENTOS	N	Media	Agrupación
3	3	7.833	A
4	3	2.403	B
2	3	1.957	B
1	3	1.943	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

3.8 Análisis de Varianza del Incremento de la cantidad de nudos en la evaluación comparativa entre medio semisólido y un sistema de inmersión temporal bajo dos concentraciones de BAP.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTOS	3	13.2534	4.4178	39.62	0.000

Error	8	0.8921	0.1115
Total	11	14.1455	

3.8.1 Comparaciones en pareja de Tukey y una confianza de 95% del Incremento de la cantidad de nudos en la evaluación comparativa entre medio semisólido y un sistema de inmersión temporal bajo dos concentraciones de BAP.

TRATAMIENTOS	N	Media	Agrupación
3	3	4.333	A
4	3	2.167	B
1	3	1.9333	B
2	3	1.7067	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

3.9 Análisis de Varianza del Incremento de la cantidad de hojas en la evaluación comparativa entre medio semisólido y un sistema de inmersión temporal bajo dos concentraciones de BAP.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTOS	3	38.276	12.7585	17.32	0.001
Error	8	5.893	0.7366		
Total	11	44.168			

3.9.1 Comparaciones en pareja de Tukey y una confianza de 95% del Incremento de la cantidad de hojas en la evaluación comparativa entre medio semisólido y un sistema de inmersión temporal bajo dos concentraciones de BAP.

TRATAMIENTOS	N	Media	Agrupación
3	3	8.000	A
4	3	7.000	A B
1	3	5.067	B C
2	3	3.360	C

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

3.10 Análisis de Varianza del Incremento de la cantidad de brotes en la evaluación comparativa entre medio semisólido y un sistema de inmersión temporal bajo dos concentraciones de BAP.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTOS	3	574.35	191.451	79.45	0.000
Error	8	19.28	2.410		
Total	11	593.63			

3.10.1 Comparaciones en pareja de Tukey y una confianza de 95% del Incremento de la cantidad de brotes en la evaluación comparativa entre medio semisólido y un sistema de inmersión temporal bajo dos concentraciones de BAP.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

TRATAMIENTOS	N	Media	Agrupación
3	3	18.00	A
2	3	3.017	B
4	3	2.100	B
1	3	1.167	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*