

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**Escuela Profesional de Agronomía**



**TESIS**

**"EFICIENCIA DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES COMO  
HERRAMIENTA PARA LA INTRODUCCIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE  
LA FRAMBUESA (*Rubus idaeus* L.) EN EL SISTEMA IN VITRO"**

Para Optar el Título Profesional de:

**INGENIERO AGRÓNOMO**

Presentado por el Bachiller:

**JONATHAN JOSÉ VÁSQUEZ CORONADO**

Asesor:

**MBA. Ing. SANTIAGO DEMETRIO MEDINA MIRANDA**

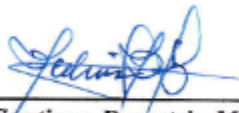
**CAJAMARCA - PERÚ**

**-2025-**

**CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD**

1. **Investigador:** Jonathan José Vásquez Coronado  
**DNI:** 42910611  
**Escuela Profesional/Unidad UNC:** Agronomía
2. **Asesor:** MBA. Ing. Santiago Demetrio Medina Miranda
3. **Facultad/Unidad UNC:** Ciencias Agrarias
4. **Grado académico o título profesional:**  
☐ Bachiller      ☒ Título profesional      ☐ Segunda especialidad  
☐ Maestro      ☐ Doctor
5. **Tipo de Investigación:**  
☒ Tesis      ☐ Trabajo de investigación      ☐ Trabajo de suficiencia profesional  
☐ Trabajo académico
6. **Título de Trabajo de Investigación:** "EFICIENCIA DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES COMO HERRAMIENTA PARA LA INTRODUCCIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE LA FRAMBUESA (*Rubus idaeus* L.) EN EL SISTEMA IN VITRO"
7. **Fecha de evaluación:** 05/01/2026
8. **Software antiplagio:** ☒ TURNITIN ☐ URKUND (OURIGINAL) (\*)
9. **Porcentaje de Informe de Similitud:** 15%
10. **Código Documento:** oid: 3117:543615257
11. **Resultado de la Evaluación de Similitud:** 15%  
☒ APROBADO      ☐ PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES O DESAPROBADO

Fecha Emisión: 05/01/2026

<small>Firma y/o Sello Emisor Constancia</small>
 <b>MBA. Ing. Santiago Demetrio Medina Miranda</b> <b>DNI: 26636144</b>

\* En caso se realizó la evaluación hasta setiembre de 2023



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

"NORTE DE LA UNIVERSIDAD PERUANA"

Fundada por Ley N° 14015, del 13 de febrero de 1962

## FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Secretaría Académica



### ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS


En la ciudad de Cajamarca, a los cinco días del mes de noviembre del año dos mil veinticinco, se reunieron en el ambiente 2C - 202 de la Facultad de Ciencias Agrarias, los miembros del Jurado, designados según **Resolución de Consejo de Facultad N°531-2025-FCA-UNC, de fecha 15 de setiembre del 2025**, con la finalidad de evaluar la sustentación de la TESIS titulada: **"EFICIENCIA DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES COMO HERRAMIENTA PARA LA INTRODUCCIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE LA FRAMBUESA (*Rubus idaeus* L.) EN EL SISTEMA IN VITRO"**, realizada por el Bachiller **JONATHAN JOSÉ VÁSQUEZ CORONADO** para optar el Título Profesional de **INGENIERO AGRÓNOMO**.

A las doce horas y cero minutos, de acuerdo a lo establecido en el **Reglamento Interno para la Obtención de Título Profesional de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca**, el Presidente del Jurado dio por iniciado el Acto de Sustentación, luego de concluida la exposición, los miembros del Jurado procedieron a la formulación de preguntas y posterior deliberación. Acto seguido, el Presidente del Jurado anunció la aprobación por unanimidad, con el calificativo de dieciocho (18); por tanto, el Bachiller queda expedito para proceder con los trámites que conlleven a la obtención del Título Profesional de **INGENIERO AGRÓNOMO**.

A las trece horas y treinta minutos del mismo día, el Presidente del Jurado dio por concluido el Acto de Sustentación.

  
Dr. Wilfredo Poma Rojas  
PRESIDENTE

  
Ing. M. Sc. Jesús Hipólito De La Cruz Rojas  
SECRETARIO

  
Ing. José Lizandro Silva Mego  
VOCAL

  
MBA. Ing. Santiago Demetrio Medina Miranda  
ASESOR

## **DEDICATORIA**

A la memoria de mis amados padres, José Ramiro Vásquez Peralta y Juana Apolonia Coronado Álamo, cuya fortaleza, amor y enseñanzas continúan guiando cada paso de mi camino.

A mis amados hijos gemelos, Joaquín José Vásquez Vásquez y Jonathan Alejandro Vásquez Vásquez, quienes con su alegría y amor iluminan mi vida y me impulsan a ser mejor cada día.

Con todo mi amor y gratitud, dedico este trabajo a ustedes.

## **AGRADECIMIENTO**

A mis queridos hermanos, Jennifer, David y Laura, por su apoyo incondicional, cariño e inspiración que me motivaron a alcanzar este objetivo.

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Justificación práctica.....	2
1.2 Justificación social.....	2
1.3 Justificación metodológica.....	3
CAPITULO II: REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1 Antecedentes de investigación.....	6
2.2 Bases teóricas.....	8
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1 Ubicación.....	14
3.2 Materiales.....	14
3.3 Metodología.....	18
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1 Resultado.....	21
4.2 Discusión.....	39
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	44
4.1 Conclusiones.....	44
4.2 Recomendaciones.....	45
CAPITULO VI: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
CAPITULO VII: ANEXOS.....	52

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Resumen Estadístico para Número de Hojas .....	21
<b>Tabla 2</b>	Resumen Estadístico para Número de Brotes .....	22
<b>Tabla 3</b>	Tabla de Frecuencia para Color de Hojas .....	22
<b>Tabla 4</b>	Tabla de Frecuencia para Aspecto de Hojas .....	23
<b>Tabla 5</b>	Tabla de Frecuencia para Color de Tallo .....	23
<b>Tabla 6</b>	Tabla de Frecuencia para Aspecto de Planta .....	24
<b>Tabla 7</b>	Tabla de Frecuencia para Sobrevivientes .....	24
<b>Tabla 8</b>	Análisis de Varianza para Sobrevivientes-Suma de Cuadrados Tipol III .....	26
<b>Tabla 9</b>	Pruebas de Múltiple Rangos para Sobrevivientes por Tiempo: Método: 95.0 porcentaje LSD .....	30
<b>Tabla 10</b>	Pruebas de Múltiple Rangos para Sobrevivientes por Concentración M&S: .....	31
<b>Tabla 11</b>	Pruebas de Múltiple Rangos para Sobrevivientes por Tipo y concentración: Método: 95.0 porcentaje LSD .....	32
<b>Tabla 12</b>	Verificación de Varianza .....	33
<b>Tabla 13</b>	Tabla ANOVA para Tasa de regeneración por .Tipo y concentración .....	33
<b>Tabla 14</b>	Pruebas de Múltiple Rangos para Tasa de regeneración por .Tipo y concentración: Método: 95.0 porcentaje LSD .....	34
<b>Tabla 15</b>	Verificación de Varianza .....	35
<b>Tabla 16</b>	Tabla ANOVA para Tasa de regeneración por .Concentración M&S	35
<b>Tabla 17</b>	Pruebas de Múltiple Rangos para Tasa de regeneración por Concentración M&S: Método: 95.0 porcentaje LSD .....	36
<b>Tabla 18</b>	Análisis de Varianza para Número de Brotes - Suma de Cuadrados Tipo III .....	37
<b>Tabla 19</b>	Pruebas de Múltiple Rangos para Número de Brotes por Tipo y concentración: Método: 95.0 porcentaje LSD .....	38
<b>Tabla 20</b>	Pruebas de Múltiple Rangos para Número de Brotes por Concentración M&S: Método: 95.0 porcentaje LSD .....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>1</b>	Gráfico del Análisis de Varianza para Sobrevivientes.....	28
<b>Figura</b>	<b>2</b>	Gráfico de Interacciones Significativas para Sobrevivientes.....	29



## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 01. Operacionalización de variables.....	52
ANEXO N° 02. Base de datos.....	55
ANEXO N° 03. Matriz de consistencia.....	108

## RESUMEN

El estudio se vincula al objetivo determinar la eficiencia del cultivo de tejidos vegetales como herramienta para la introducción y establecimiento de la frambuesa (*Rubus Idaeus* L.) en el sistema in vitro; mediante un enfoque cuantitativo de diseño experimental con una muestra de 120 cultivos observados durante 7 semanas. A los cuales se les aplicó la técnica observación y el instrumento ficha de observación. Los resultados evidencian que se observa una interacción significativa entre tipo y concentración hormonal y concentración MS (AB), con una razón-F de 6.79 ( $P = 0.0000$ ). Esto implica que la combinación adecuada de estos dos factores puede mejorar significativamente los resultados del cultivo in vitro. Finalmente, se concluye que el cultivo de tejidos vegetales ha demostrado ser una herramienta eficiente para la introducción y establecimiento de la frambuesa (*Rubus Idaeus* L.) en sistemas in vitro. Bajo las condiciones experimentales evaluadas, es posible obtener una alta tasa de sobrevivencia y regeneración de explantes, lo que facilita la producción de plantas sanas y libres de enfermedades.

**Palabras clave:** eficiencia, cultivo de tejidos, *Rubus Idaeus* L., in vitro.

## ABSTRACT

The study is linked to the objective of determining the efficiency of plant tissue culture as a tool for the introduction and establishment of raspberry (*Rubus Idaeus* L.) in the in vitro system; through a quantitative approach of experimental design with a sample of 120 cultures observed during 7 weeks. The observation technique and the observation card instrument were applied to them. The results show that there is a significant interaction between hormone type and concentration and DM concentration (AB), with an F-ratio of 6.79 ( $P = 0.0000$ ). This implies that the appropriate combination of these two factors can significantly improve the results of in vitro culture. Finally, it is concluded that plant tissue culture has proven to be an efficient tool for the introduction and establishment of raspberry (*Rubus Idaeus* L.) in in vitro systems. Under the experimental conditions evaluated, it is possible to obtain a high survival and regeneration rate of explants, which facilitates the production of healthy and disease-free plants.

**Keywords:** efficiency, tissue culture, *Rubus Idaeus* L., in vitro.

## **CAPITULO I: INTRODUCCIÓN**

La frambuesa (*Rubus idaeus* L.) es un arbusto perenne de la familia Rosaceae, ampliamente valorado por sus frutos ricos en compuestos bioactivos, como antocianinas y vitamina C, que le confieren propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Anastacio et al., 2024). Estos beneficios han incrementado su demanda en mercados internacionales, especialmente en Europa, donde se aprecia tanto en fresco como en productos procesados.

La propagación tradicional de la frambuesa se realiza mediante métodos vegetativos, como la separación de coronas o brotes etiolados; sin embargo, estos métodos resultan insuficientes para satisfacer la creciente demanda de material vegetal sano y vigoroso (Jones & Flores, 2007). En este contexto, el cultivo de tejidos vegetales emerge como una herramienta eficaz para la micropropagación de frambuesa, permitiendo la producción masiva de plantones libres de patógenos y con uniformidad genética.

Estudios recientes han explorado diversas técnicas para optimizar la micropropagación de frambuesa. Por ejemplo, la utilización de sistemas de inmersión temporal ha mostrado ser una alternativa eficiente para la producción de plantas, mejorando la calidad y reduciendo los costos de producción (Vilchez et al., 2015). Asimismo, la aplicación de nanopartículas de plata en los medios de cultivo ha demostrado reducir la contaminación microbiana y promover el desarrollo de los explantes durante la micropropagación (Sarmast & Salehi, 2016).

Además, la combinación de reguladores de crecimiento vegetal, como benciladenina y brasinolido, ha sido efectiva en la formación y elongación de brotes adventicios de frambuesa, mejorando la eficiencia del proceso de micropropagación (Ramírez et al., 2020). Estos avances tecnológicos en el cultivo in vitro de frambuesa no solo facilitan su introducción y establecimiento en nuevas regiones, sino que también contribuyen a satisfacer la demanda del mercado europeo, garantizando la producción de frutos de alta calidad genética y sanitaria.

Por lo tanto, debido a la finalidad con la que se realiza la propagación, la técnica tiene un enorme potencial comercial sobre todo si se aplica a una especie como la frambuesa de reciente introducción en la región Cajamarca.

El objetivo general fue determinar la eficiencia del cultivo de tejidos vegetales como herramienta para la introducción y establecimiento de la frambuesa (*Rubus Idaeus* L.) en el sistema in vitro. Por lo cual los objetivos específicos fueron: (a) Identificar las diferencias significativas en la tasa de regeneración de los explantes de frambuesa bajo diferentes condiciones de tipo y concentración de cultivo in vitro. (b) Evaluar las diferencias significativas en la tasa de regeneración de los explantes de frambuesa bajo diferentes condiciones de concentración de M&S de cultivo in vitro. (c) Evaluar la relación entre las concentraciones de hormonas de crecimiento y la proliferación de tejidos de frambuesa.

### **1.1 Justificación práctica**

La frambuesa (*Rubus idaeus* L.) es una especie de alto valor biológico debido a su contenido de compuestos bioactivos como antocianinas, flavonoides y ácido elágico, que le confieren propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antiinflamatorias. Introducir este cultivo en Cajamarca no solo diversifica la agrobiodiversidad de la región, sino que también promueve un aprovechamiento sostenible de las condiciones edafoclimáticas locales. Al emplear técnicas avanzadas de clonación in vitro, se garantiza la obtención de plantones genéticamente uniformes, libres de patógenos y adaptados a las características ambientales de la región. Este proceso no solo asegura la productividad del cultivo, sino que también contribuye a la conservación de recursos genéticos y a la estabilidad ecológica en el agroecosistema de Cajamarca.

### **1.2 Justificación social**

La implementación de un huerto clonal de frambuesa en Cajamarca responde a la necesidad de ofrecer alternativas agrícolas rentables y sostenibles para los agricultores de la región. La producción de plantones de calidad no solo mejorará los

ingresos económicos de las familias campesinas, sino que también generará empleo en actividades relacionadas con la propagación, cultivo y comercialización del fruto. Asimismo, el acceso a plántones certificados fomentará la competitividad de los productores locales en mercados nacionales e internacionales, respondiendo a la creciente demanda de productos saludables y de alto valor nutricional. En el largo plazo, este proyecto fortalecerá la seguridad alimentaria y el bienestar social de la comunidad agrícola cajamarquina.

### **1.3 Justificación metodológica**

El enfoque cuantitativo con un diseño experimental es idóneo para esta investigación, ya que permite evaluar de manera rigurosa las variables asociadas al establecimiento y clonaje in vitro de la frambuesa. Mediante este diseño, se realizarán experimentos controlados para determinar las condiciones óptimas de cultivo, como los medios de propagación, reguladores de crecimiento y técnicas de esterilización. Este enfoque garantiza resultados replicables y validados estadísticamente, facilitando la extrapolación de los hallazgos a contextos similares. Además, el uso de protocolos experimentales permitirá comparar distintos tratamientos, optimizando el proceso de micropropagación y asegurando su viabilidad técnica y económica. La metodología propuesta no solo contribuirá al desarrollo del cultivo de frambuesa en Cajamarca, sino que también servirá como base para futuras investigaciones en propagación de cultivos alternativos en la región.

El Perú, reconocido como uno de los países con mayor diversidad bioclimática en el mundo, alberga 78 de los 105 tipos de clima existentes a nivel global. Esta variabilidad climática brinda un escenario propicio para la introducción de especies vegetales, lo que no solo incrementa la diversidad de cultivos, sino que también amplía la oferta de productos frescos de alto valor en el mercado, como la frambuesa (*Rubus idaeus* L.). Cajamarca, en particular, destaca por poseer condiciones edafoclimáticas óptimas para el cultivo de esta especie, ofreciendo suelos fértiles, temperaturas moderadas y una adecuada disponibilidad hídrica. No obstante, a pesar de este potencial, la región carece de huertos clonales especializados en frambuesa que puedan calificarse como

centros de producción de material vegetal certificado, necesario para abastecer a los agricultores interesados en su cultivo.

En países como Chile, la frambuesa presenta rendimientos altamente competitivos que oscilan entre 8,000 y 12,000 kg/ha, generando ingresos netos por campaña de hasta \$14,000 USD/ha. Sin embargo, en el Perú, el desarrollo de esta especie enfrenta serias limitaciones. Una de las principales barreras es la ausencia de protocolos estandarizados para la propagación in vitro de plántulas libres de patógenos, cuya pureza varietal y sanidad estén certificadas. Este tipo de material es crucial para asegurar la calidad y productividad del cultivo, dado que otros propágulos, ya sean semillas botánicas o vegetativas, deben someterse a estrictos procesos cuarentenarios antes de ser empleados en sistemas agrícolas abiertos, según las normativas vigentes.

En este contexto, instituciones como el Ministerio de Agricultura, Procesadora Sac y Agronec S.A. han comenzado a implementar iniciativas para superar estas limitaciones. En el último trimestre, dichas entidades gestionaron la importación de 30 plantas de frambuesa certificadas, las cuales fueron donadas como "plantas madre" con el objetivo de iniciar su micropropagación mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales. Este enfoque ofrece una solución sostenible y escalable, permitiendo la producción masiva de material clonal de alta calidad genética y sanitaria.

Ante esta problemática, se hace imprescindible diseñar y optimizar protocolos específicos de clonación in vitro, los cuales no solo garanticen la multiplicación eficiente y sostenible de la frambuesa (*Rubus idaeus* L.), sino que también sienten las bases para la implementación de un huerto semillero clonal en Cajamarca. Este enfoque permitirá producir material vegetal de alta calidad genética y sanitaria, adaptado a las condiciones locales, asegurando así el éxito en la introducción y desarrollo del cultivo en la región, con impactos significativos en términos de productividad y competitividad agrícola.

Finalmente, la formulación del problema fue ¿Cuál es el nivel de eficiencia de la técnica de cultivo de tejidos vegetales como herramientas para la introducción y

establecimiento de la frambuesa en el sistema in vitro? Y la hipótesis fue: El cultivo de tejidos vegetales como herramienta para la introducción y establecimiento de la frambuesa en el sistema in vitro es de alta eficiencia.



## **CAPITULO II: REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Antecedentes de investigación**

Wang et al. (2005) desarrollaron el primer procedimiento eficiente de criopreservación para brotes in vitro de frambuesa utilizando técnicas de encapsulación-vitrificación (EnVi) y encapsulación-dsecación (EnDe). En principio, compararon ambas metodologías y observaron tasas superiores de supervivencia y regeneración (85% y 75%, respectivamente) con EnVi. Asimismo, estudios histológicos confirmaron la mayor protección de las células meristemáticas mediante el método EnVi. Finalmente, concluyeron que esta técnica constituye una opción simple y eficaz para la conservación prolongada del germoplasma de *Rubus idaeus*.

Georgieva et al. (2004) estudiaron la respuesta de varios cultivares y líneas élite de frambuesa búlgaros a estrés osmótico bajo condiciones de cultivo in vitro. Primero, utilizaron polietilenglicol (PEG) para simular sequía y distinguir genotipos tolerantes de los susceptibles. Posteriormente, identificaron 'Bulgarski rubin' y 'Elite 1' como los más resistentes, ya que mantuvieron mejor crecimiento y estabilidad de membrana. Finalmente, propusieron continuar los ensayos a campo, con miras a optimizar programas de mejoramiento genético frente a condiciones abióticas adversas.

Mallery et al. (2007) desarrollaron geles mucoadhesivos que contenían frambuesas negras liofilizadas (FBR) y evaluaron la estabilidad de sus antocianinas, así como su absorción en tejidos orales. En primer lugar, prepararon geles con 5% y 10% de FBR en rangos de pH de 3.5 a 7.5 y midieron la degradación de las antocianinas a distintas temperaturas. Además, comprobaron que, a pH bajo y 4°C, se alcanzaba mayor estabilidad. Por último, observaron que las antocianinas penetraban rápidamente en la mucosa oral y llegaban al torrente sanguíneo en cinco minutos, lo que subraya el potencial de estos geles para la quimioprevención del cáncer oral.

Nam et al. (2016) analizaron la eficacia de las citocininas tidiazurón (TDZ) y 4-PU en la micropropagación de genotipos de frambuesa de fructificación continua.

Inicialmente, compararon la respuesta de diferentes explantes en medios con TDZ, 4-PU y 6-BAP. Posteriormente, demostraron que TDZ y 4-PU producían entre 9.57 y 14 brotes por explante, superando con creces los resultados obtenidos con 6-BAP (1.75–4.4). Por consiguiente, recomendaron ambas citocininas para acelerar la multiplicación clonal de híbridos valiosos de frambuesa.

Wang y Valkonen (2009) se propusieron mejorar la recuperación de brotes de frambuesa tras la aplicación combinada de termoterapia y crioterapia para eliminar el Raspberry bushy dwarf virus (RBDV). Primero, preacondicionaron brotes con ácido salicílico y añadieron hierro para prevenir la clorosis. Luego, observaron que la supervivencia de los brotes tras la crioterapia aumentaba significativamente, alcanzando un 33% de regeneración. Así, concluyeron que la termoterapia previa y el suplemento de hierro optimizan la eficacia de la crioconservación en frambuesa.

Mohammadsadeghi et al. (2023) llevaron a cabo estudios *in silico* e *in vitro* para valorar la capacidad de nuevos derivados sintéticos de tirosol y cetona de frambuesa en la inhibición de la tirosinasa de hongo. Primeramente, analizaron la unión de los ligandos a la enzima mediante acoplamiento molecular, obteniendo interacciones favorables en los sitios activos. Después, validaron su eficacia *in vitro*, destacando el compuesto 1d con un 77% de inhibición y un IC<sub>50</sub> de 0.32  $\mu$ M. En consecuencia, propusieron estos compuestos como potenciales inhibidores de la melanogénesis para aplicaciones industriales o terapéuticas.

Georgieva et al. (2016) examinaron la propagación *in vitro* de cuatro especies de frutos silvestres búlgaros —entre ellas la frambuesa— y analizaron la actividad antioxidante de sus frutos. Inicialmente, cultivaron los brotes en medio MS con IBA, BAP y GA, registrando hasta 6.8 brotes por explante en frambuesa. Luego, midieron el contenido fenólico total y la capacidad antioxidante de los extractos frutales, detectando valores variables en función de la especie y el tratamiento. De esta manera, confirmaron el valor de la propagación *in vitro* para preservar y explotar la calidad nutracéutica de estas especies.

## **2.2 Bases teóricas**

### **2.2.1. Cultivo in vitro de Tejidos. Generalidades**

El cultivo in vitro de tejidos se fundamenta en el principio de totipotencia de la célula vegetal, el cual permite que un explante (porción de tejido) sea capaz de regenerar órganos o incluso plantas completas en condiciones controladas de humedad, temperatura e iluminación (Georgieva et al., 2004; Nam et al., 2016; Georgieva et al., 2016). Estudios previos señalan que la micropropagación es una técnica sumamente efectiva para la producción masiva de material vegetal seleccionado, permitiendo obtener cultivares libres de patógenos y con alta estabilidad genética en un periodo de tiempo relativamente corto (Ryan et al., 2001; Coates et al., 2007; Chan et al., 2023).

La eficiencia de la micropropagación se ve reflejada en un aumento en la cantidad de brotes y en la reducción de problemas fitosanitarios cuando se trabaja con protocolos adecuados (Cefali et al., 2019; Rojas-Vera et al., 2002). Adicionalmente, la manipulación de factores como el fotoperiodo y las concentraciones de nutrientes en el medio de cultivo permite optimizar la viabilidad de los explantes (Tomas, 2022; McDougall et al., 2005).

### **2.2.2. Selección del Medio de Cultivo y Reguladores de Crecimiento**

La selección del medio de cultivo resulta un factor determinante para el éxito en la propagación in vitro (Georgieva et al., 2004; Nam et al., 2016). Diversas investigaciones han empleado fórmulas basadas en Murashige & Skoog (MS), ajustando macro y micronutrientes, así como vitaminas y fuentes de carbono, para cultivar especies de *Rubus* (Zheng et al., 2010; Gledovic et al., 2020; Shi et al., 2023). Paralelamente, el uso de reguladores de crecimiento —auxinas, citocininas y giberelinas— permite inducir la formación de brotes, estimular la división celular y mejorar la elongación (Shi et al., 2021; Mallery et al., 2007; Eskra et al., 2020). Dentro de las citocininas, el tidiazurón (TDZ) y el 4-PU han demostrado gran eficacia para la

multiplicación de brotes en frambuesas, superando en ciertos casos la acción de la benzilaminopurina (BAP) (Nam et al., 2016; Alizadeh et al., 2023).

Algunos protocolos incluyen bajas concentraciones de auxinas como el ácido indolbutírico (IBA) para mejorar la formación de raíces antes de la aclimatación (Sapieha-Waszkiewicz et al., 2011; Rojas-Vera et al., 2002). Incluso, se ha observado que la presencia de fibra dietética o sustancias suplementarias en el medio puede influir en la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y en el crecimiento de los explantes (Tomas, 2022; Mahadevan et al., 2005).

### **2.2.3. Establecimiento in vitro y Desinfección del Material**

El establecimiento in vitro inicia con la selección y desinfección de los explantes, etapa donde se suelen emplear hipocloritos o fungicidas/bactericidas de acción superficial (Georgieva et al., 2004; Alizadeh et al., 2023). Este paso es crítico para reducir la contaminación y garantizar la supervivencia inicial de los tejidos (Bilavcik et al., 2024; Desai et al., 2010). Se recomienda trabajar en cabinas de flujo laminar para asegurar condiciones estériles, minimizando el riesgo de infecciones por hongos o bacterias que compitan con el explante (Ryan et al., 2001; Chan et al., 2023).

Además, la selección de meristemos apicales o yemas axilares contribuye a mantener la estabilidad genética y a disminuir la presencia de patógenos (Wang & Valkonen, 2009; Nam et al., 2016). Una vez logrado el establecimiento, los explantes se transfieren al medio de cultivo, donde comienza la fase de multiplicación y/o brotación (Shi et al., 2021; Mallery et al., 2007).

### **2.2.4. Micropropagación en Medios Semisólidos y Líquidos**

Tradicionalmente, el cultivo en medio semisólido se ha empleado para la propagación de frambuesas, logrando resultados satisfactorios en la formación de brotes (Georgieva et al., 2004; Wang & Valkonen, 2009). Sin embargo, su escalamiento puede elevar los costos por la necesidad de numerosos frascos y repetidas subculturas (Bilavcik et al., 2024; Desai et al., 2010).

Como alternativa, los sistemas líquidos de inmersión temporal pueden optimizar la oxigenación de los explantes y reducir la mano de obra (Wang et al., 2005; Cefali et al., 2019). Este método, no obstante, requiere controlar con precisión la duración y frecuencia de la inmersión para evitar hiperhidricidad (Zheng et al., 2010; Gledovic et al., 2020). En casos donde se incorporan suplementos adicionales, como extractos naturales o fuentes alternativas de nitrógeno, el comportamiento de los explantes puede verse modificado, impactando la multiplicación clonal (McDougall et al., 2005; Simonovic et al., 2021).

#### **2.2.5. Etapas de Enraizamiento y Aclimatación**

Finalizada la fase de multiplicación de brotes, se requiere una etapa de enraizamiento para consolidar las plántulas y prepararlas para la aclimatación (Rojas-Vera et al., 2002; Shi et al., 2023). La adición de auxinas en el medio potencia la formación de raíces que, al ser funcionales, mejoran la supervivencia durante el trasplante a condiciones ex vitro (Mahadevan et al., 2005; González-Barrio et al., 2011). La aclimatación consiste en la transición de las plantas hacia un ambiente con mayores fluctuaciones de temperatura, luz y humedad, lo cual puede acompañarse de cambios en la actividad metabólica y defensas antioxidantes (Chan et al., 2023; Eskra et al., 2020).

#### **2.2.6. Criopreservación y Conservación de Germoplasma**

La propagación in vitro se complementa con métodos de conservación a largo plazo para garantizar la disponibilidad de genotipos valiosos (Wang et al., 2005; Bilavcik et al., 2024). La criopreservación se ha convertido en una de las estrategias más efectivas para este fin, ya que los explantes se almacenan a temperaturas muy bajas (nitrógeno líquido) con mínimas alteraciones fisiológicas (Coates et al., 2007; Mohammadsadeghi et al., 2023).

Encapsulación-vitrificación (EnVi) y encapsulación-desección (EnDe): Son técnicas que han mostrado elevados porcentajes de regeneración en frambuesa (Wang et al., 2005).

Protocolos sin DMSO: Investigaciones recientes reportan una alta eficiencia en la eliminación de virus y la supervivencia postdescongelación prescindiendo de este agente crioprotector (Bilavcik et al., 2024).

Estas técnicas permiten, además, preservar las propiedades antioxidantes y bioactivas de los tejidos, como han sugerido diversos estudios que relacionan la conservación prolongada con la estabilidad de compuestos fenólicos (Sapieha-Waszkiewicz et al., 2011; Mahadevan et al., 2005; Mallery et al., 2007).

#### **2.2.7. Aportes del Cultivo in vitro en la Calidad Nutricional y Fitoquímica**

Adicionalmente, el cultivo in vitro se ha empleado para evaluar el contenido de compuestos bioactivos (por ejemplo, antocianinas y elagitaninos) que influyen en el valor nutracéutico de la frambuesa (González-Barrio et al., 2011; Coates et al., 2007). Varios trabajos han destacado la relevancia de la concentración de flavonoides y polifenoles durante las diferentes etapas de propagación, así como su bioaccesibilidad tras la digestión (Tomas, 2022; McDougall et al., 2005; Shi et al., 2021).

En este sentido, el manejo de los explantes bajo condiciones controladas puede incrementar la producción de metabolitos secundarios, reflejándose en propiedades antioxidantes y antiinflamatorias potencialmente más elevadas (Mallery et al., 2007; Chan et al., 2023). Igualmente, se ha investigado el uso de extractos de semillas y hojas con fines terapéuticos, obteniéndose resultados promisorios en líneas celulares de cáncer, procesos infecciosos y aplicaciones cosméticas (Ryan et al., 2001; Desai et al., 2010; Gledovic et al., 2020; Simonovic et al., 2021).

### 2.2.8. Perspectivas Futuras en la Propagación de Frambuesas

La combinación de técnicas de micropropagación, sistemas de inmersión temporal y protocolos de criopreservación se perfila como la vía más sólida para asegurar un abastecimiento continuo de plantas libres de enfermedades y genéticamente estables (Nam et al., 2016; Wang & Valkonen, 2009). Avances recientes sugieren la posibilidad de incorporar herramientas biotecnológicas adicionales —como la edición génica o la manipulación de la microbiota asociada— para potenciar la resistencia de las frambuesas a plagas y patógenos (Zheng et al., 2010; Mohammadsadeghi et al., 2023; Alizadeh et al., 2023).

Por otra parte, la optimización de los medios de cultivo y la experimentación con sustancias naturales (por ejemplo, polvos vegetales, fibra dietética o extractos frutales) continúan siendo un campo de estudio atractivo para mejorar tanto el rendimiento en la propagación como la calidad nutracéutica de las plantas (Tomas, 2022; Shi et al., 2023; Eskra et al., 2020). A mediano y largo plazo, estas innovaciones podrían repercutir en la industria frutícola con aumentos significativos en la productividad y en la diversidad de productos derivados de la frambuesa.

### 2.2.9 Definición de términos

**Cultivo in vitro de tejidos:** El cultivo in vitro de tejidos es un proceso biotecnológico que se basa en la totipotencia de la célula vegetal, lo que significa que un fragmento de tejido (explante) puede regenerar órganos o incluso una planta completa en condiciones controladas. Este proceso se realiza bajo condiciones específicas de humedad, temperatura e iluminación (Nam et al., 2016; Georgieva et al., 2016).

**Micropropagación:** Es una técnica de cultivo in vitro utilizada para la producción masiva de material vegetal genéticamente estable y libre de patógenos. Es una de las técnicas más efectivas para la propagación rápida de plantas (Chan et al., 2023).

**Reguladores de crecimiento:** Son compuestos que controlan o modulan el crecimiento y desarrollo de las plantas, como auxinas, citocininas y giberelinas. Estas sustancias permiten inducir la formación de brotes, estimular la división celular y mejorar la elongación de los tejidos (Shi et al., 2021; Eskra et al., 2020).

**Fotoperiodo:** Es el ciclo de luz y oscuridad al que están expuestas las plantas. Manipular este factor puede optimizar la viabilidad de los explantes en cultivo in vitro (Tomas, 2022).

**Desinfección del material:** Es un paso crítico en la propagación in vitro que implica el tratamiento de los explantes con agentes como hipocloritos o fungicidas para reducir la contaminación y asegurar la supervivencia de los tejidos en el cultivo (Alizadeh et al., 2023).

**Medio de cultivo:** Es una mezcla de nutrientes, vitaminas y reguladores de crecimiento utilizada para cultivar tejidos vegetales en condiciones controladas. La elección del medio adecuado es crucial para el éxito de la propagación in vitro (Georgieva et al., 2004).

**Criopreservación:** Es una técnica de conservación a largo plazo que implica almacenar material biológico a temperaturas muy bajas (generalmente usando nitrógeno líquido) para preservar la viabilidad y estabilidad genética de los explantes (Mohammadsadeghi et al., 2023).

**Bioaccesibilidad:** Se refiere a la cantidad de un compuesto bioactivo que está disponible para ser absorbido y utilizado por el cuerpo después de la digestión. En el contexto del cultivo in vitro, la manipulación de las condiciones de cultivo puede influir en la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos en las plantas (Tomas, 2022).



## **CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 Ubicación**

El presente experimento se ejecutará en el laboratorio de biotecnología vegetal, ubicada en el ambiente 2G-30I de la Escuela Académico Profesional de Agronomía de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca ubicado a 2536 msnm., a 07°18' de latitud sur y a 38°30' de longitud oeste.

### **3.2 Materiales**

#### **3.2.1 Material Biológico**

**Plantas madre de Frambuesa:** Se utilizan como fuente de explantos para el cultivo de tejidos vegetales. Estas plantas deben ser sanas, libres de patógenos y virus-testadas para asegurar la calidad del material de cultivo.

#### **3.2.2 Material de Campo**

- a) **Sustrato:** Se prepara un sustrato adecuado para la aclimatación de las plántulas in vitro, como una mezcla de turba y arena en proporciones específicas para facilitar la adaptación de las plantas al ambiente ex vitro.
- b) **Invernaderos:** Los invernaderos son esenciales para la aclimatación de las plántulas, proporcionando un ambiente controlado con condiciones de luz, temperatura y humedad óptimas para el crecimiento inicial de las plantas.
- c) **Plantas de Campo:** En algunos casos, se pueden utilizar plantas de campo como fuente de explantos, especialmente si se busca introducir variedades específicas o realizar estudios de adaptación.

#### **3.3.3 Material y Equipo de Laboratorio**

##### **Equipos:**

- a) **Autoclave vertical automático (Analógico):** Para esterilizar medios de cultivo, instrumentos y material de cultivo.
- b) **Cámara de flujo laminar (EEE):** Espacio estéril para la manipulación de explantos y la transferencia de material vegetal.

- c) **Potenciómetro (Orión Research):** Para medir y ajustar el pH de los medios de cultivo.
- d) **Dispensador de medios:** Para distribuir los medios de cultivo en los recipientes de cultivo.
- e) **Temporizador:** Para controlar el tiempo de incubación y otros procesos.
- f) **Refrigeradora:** Para almacenar soluciones y medios de cultivo antes de su uso.
- g) **Agitador magnético:** Para mezclar soluciones y medios de cultivo.
- h) **Destilador de agua:** Para obtener agua destilada necesaria en la preparación de medios de cultivo.
- i) **Balanza analítica:** Para pesar con precisión los componentes de los medios de cultivo.
- j) **Cocina eléctrica:** Para calentar y preparar soluciones y medios de cultivo.

#### **Materiales:**

- a) **Tubos de ensayo de 23mm X 150 mm:** Para el cultivo de tejidos.
- b) **Erlenmeyer pyrex de 250, 500 y 1000 ml:** Para preparar y almacenar soluciones.
- c) **Beakers de 250, 500 y 1000 ml:** Para mezclar y medir soluciones.
- d) **Placas Petri de 9 cm de diámetro:** Para el cultivo de tejidos y la observación de crecimiento.
- e) **Vaguetas, pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml:** Para medir y transferir volúmenes pequeños de líquidos.
- f) **Probetas pyrex de 10, 50, 100, 500 y 1000 ml:** Para medir volúmenes de líquidos.
- g) **Balones pyrex de 1 y 6 litros:** Para preparar grandes volúmenes de soluciones.
- h) **Mecheros de alcohol:** Para esterilizar instrumentos.

- i) **Papel aluminio:** Para envolver recipientes y evitar la contaminación.
- j) **Parafilm:** Para sellar recipientes de cultivo.
- k) **Mango y hoja de bisturí N° 10 y 20:** Para cortar y manipular explantos.
- l) **Picetas de 500ml:** Para transferir líquidos.
- m) **Tijeras, pinzas, gradillas, espátulas:** Para manipular y organizar material de cultivo.
- n) **Alcohol de 96°:** Para la esterilización de instrumentos y superficies.
- o) **Algodón:** Para la esterilización y limpieza.
- p) **Papel secante:** Para secar instrumentos y superficies.
- q) **Guardapolvos:** Para mantener la esterilidad en el laboratorio.

## **Productos químicos:**

### **A. Macro nutrientes:**

- a) Nitrato de calcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )
- b) Nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )
- c) Nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ )
- d) Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- e) Cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ )
- f) Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- g) Sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )
- h) Fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- i) Fosfato monobásico de amonio ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ )
- j) Fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )

### **B. Micronutrientes:**

- a) Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )

- b) Ácido etilendiaminacético (EDTA)
- c) Sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- d) Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )
- e) Sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- f) Sulfato de manganeso ( $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- g) Cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
- h) Molibdato de sodio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- i) Yoduro de potasio (KI)

**c. Vitaminas:**

- a) Tiamina-HCl ( $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OS} \cdot \text{H}_2\text{O}$ )
- b) Myo inositol ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )
- c) Biotina ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ )
- d) Ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ )
- e) Ácido nítrico ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ )
- f) Rivo flavina ( $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$ )
- g) Colina ( $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{NOCl}$ )
- h) Piridoxina ( $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$ )
- i) Ácido pantoténico ( $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_5$ )

**D. Aminoácidos:**

- a) Glicina
- b) Cisteína

**E. Reguladores de crecimiento:**

- a) Auxinas: Ácido u-naftalenacético (ANA)
- b) Citoquininas: Bencilaminopurina (BAP), Kinetina (K)

**F. Fuentes de energía:**

- a) Sacarosa

**G. Modificadores de pH:**

- a) Hidróxido de potasio (KOH)
- b) Ácido clorhídrico (HCl)

**H. Agente Solidificante:**

- a) Agar (Bacto Agar Difco)

**Otros materiales:**

- a) **Termohidrógrafo:** Para medir y registrar la temperatura y la humedad.
- b) **Luxómetro:** Para medir la intensidad de la luz.
- c) **Literatura especializada:** Para consultar protocolos y técnicas de cultivo de tejidos vegetales.

**Material experimental:**

**Plantas madre de Frambuesa:** Se utilizan como fuente de explantos para el cultivo de tejidos vegetales. Estas plantas deben ser sanas, libres de patógenos y virus-testadas para asegurar la calidad del material de cultivo.

**Medios de cultivo:** Murashige & Skoog (1962), MS 1962 (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>)/4, Sheldrake et al (1973), Hildebrant (1974), de Fossard et al (1975), Gupta(1986).

### **3.3 Metodología**

La metodología empleada en este estudio adoptó un enfoque cuantitativo con un diseño experimental en el nivel de un experimento puro. La población consistió en 840 explantes de frambuesa (*Rubus idaeus* L.), de los cuales se seleccionó una muestra exhaustiva de 840 unidades para asegurar una representación completa. La recolección de datos se llevó a cabo mediante técnicas de observación, utilizando una ficha de observación estandarizada como instrumento principal para registrar sistemáticamente las variables. Este marco buscó evaluar la eficiencia del cultivo de tejidos vegetales como herramienta para la introducción y establecimiento de la

frambuesa (*Rubus idaeus* L.) en el sistema in vitro, específicamente evaluando la influencia de diversas covariables, efectos principales e interacciones sobre la tasa de sobrevivencia de los explantes.

### 3.3.1 Fase de introducción

A) Tratamiento de plantas Madre:

- Condiciones simuladas de T°, H°R° y fotoperiodo óptimo.
- Fertirrigación acorde a la ejecución de la especie.
- Tratamiento de las plantas madres con Fungicidas (PCNB 3%) para prevención de hongos.

### 3.3.2 Fase de establecimiento

Factor Nutriente: Concentración de nutrientes en el medio de cultivo (Murashige & Skoog, 1962). no: 0% (Testigo)

n1: 50%

no: 0%

n3: 100%

Factor H: Tipo y concentración de regulador del crecimiento. ho: 0 (Testigo)

h1: 2ppm BAP + 0.15ppm α-ANA h2: 4ppm BAP + 0.3ppm α-ANA h3: 8ppm BAP + 0.6ppm α-ANA

**Tabla 02**

Tratamientos en estudio.

N°	TRATAMIENTOS	
	CLAVE	DESCRIPCIÓN
1	n0h0	0% nutrientes + [0ppm BAP + 0ppm α-ANA]
2	n0h1	0% nutrientes + [2ppm BAP + 0.15ppm α-ANA]
3	n0h2	0% nutrientes + [4ppm BAP + 0.3ppm α-ANA]
4	n0h3	0% nutrientes + [8ppm BAP + 0.6ppm α-ANA]
5	n1h0	50% nutrientes + [0ppm BAP + 0ppm α-ANA]
6	n1h1	50% nutrientes + [2ppm BAP + 0.15ppm α-ANA]

7	n1h2	50% nutrientes + [4ppm BAP + 0.3ppm $\alpha$ -ANA]
8	n1h3	50% nutrientes + [8ppm BAP + 0.6ppm $\alpha$ -ANA]
9	n3h0	100% nutrientes + [0ppm BAP + 0ppm $\alpha$ -ANA]
10	n3h1	100% nutrientes + [2ppm BAP + 0.15ppm $\alpha$ -ANA]
11	n3h2	100% nutrientes + [4ppm BAP + 0.3ppm $\alpha$ -ANA]
12	n3h3	100% nutrientes + [8ppm BAP + 0.6ppm $\alpha$ -ANA]

---

Diseño completamente randomizado bajo arreglo diferencial 3X4, con 12 tratamientos, 3 repeticiones y 10 unidades experimentales por tratamiento

### 3.3.3 Fase introducción

B) Aislamiento de explantas (microestacas) del tercio central de las plantas madres.

C) Desinfección de superficie de explantas:

- 2 horas de lavado en H<sub>2</sub>O por agua corriente.
- Tratamiento por inmersión en:
  - a) Solución de hipoclorito de sodio al 0.5% X 10'
  - b) Enjuagues consecutivos (3 a 4) en H<sub>2</sub>O destilada estéril. c) Alcohol etílico al 70% X 1'
  - d) Enjuagues consecutivos (3 a 4) en H<sub>2</sub>O destilada estéril.
  - e) Solución anti-oxidante [Ac, Cítrico 100ppm]/Ac. Ascórbico(100ppm) de C/U.

D) Siembra in vitro:

- a) Superficie del medio de cultivo M.S. (1962) semisólido, con sus nutrientes diluidos al 50% sin reguladores del crecimiento y carbón activo (1.5%).

E) Incubación de explantas:

- a) Hecha la siembra, la explanta de incubación en plena oscuridad por las próximas 72 horas.
- b) Transcurrido el periodo oscuro, los explantas serán incubados bajo 16 horas de fotoperiodo, y 20 ± 5°C de temperatura.
- c) Ocho días después de la siembra se evaluará la sobrevivencia de explantas.

## CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Resultado

#### Análisis descriptivo

**Tabla 1**  
*Resumen Estadístico para Número de Hojas*

<b>Estadísticas</b>	<b>Valor</b>
Recuento	840
Promedio	2.37381
Desviación Estándar	3.21843
Coefficiente de Variación	135.581%
Mínimo	1.0
Máximo	14.0

Nota. Elaboración propia mediante la base de datos.

La Tabla 1: Resumen Estadístico para Número de Hojas revela información clave sobre el comportamiento de los explantes en el cultivo in vitro. Con un tamaño muestral de 840 observaciones, se evidencia una amplia variabilidad en la generación de hojas, con un promedio bajo de 2.37 hojas por explante y una desviación estándar alta de 3.22. Esto indica que los datos están dispersos y que la producción foliar no es homogénea entre los explantes analizados. El coeficiente de variación, que asciende al 135.58%, refuerza la idea de que existe una variabilidad relativa significativa respecto al promedio. Este nivel de dispersión puede estar influenciado por factores experimentales como las condiciones del medio de cultivo, la concentración hormonal o las características intrínsecas de los explantes. Por último, el rango observado, que va desde un mínimo de 1 hoja hasta un máximo de 14 hojas, muestra una diferencia considerable en la capacidad regenerativa foliar.



**Tabla 2**  
*Resumen Estadístico para Número de Brotes*

<b>Estadísticas</b>	<b>Valor</b>
Recuento	840
Promedio	1.78095
Desviación Estándar	1.48239
Coeficiente de Variación	83.236%
Mínimo	1.0
Máximo	7.0

Nota. Elaboración propia mediante la base de datos.

La Tabla 2 proporciona un análisis descriptivo de los datos obtenidos en el cultivo de tejidos vegetales de frambuesa bajo condiciones controladas. Con un total de 840 observaciones, se evidencia una producción promedio de brotes baja, equivalente a 1.78 brotes por explante, lo que refleja una limitada proliferación en las condiciones experimentales evaluadas. La desviación estándar, con un valor de 1.48, indica una dispersión moderada en los datos, mientras que el coeficiente de variación del 83.23% señala una variabilidad relativa significativa respecto al promedio. El rango observado entre el valor mínimo (1 brote) y el máximo (7 brotes) es de 6 unidades, lo que muestra diferencias notables en la capacidad regenerativa entre los explantes analizados.

**Tabla 3**  
*Tabla de Frecuencia para Color de Hojas*

<b>Clase</b>	<b>Valor</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
Pardo	1	23	2.73
Amarillo	2	89	10.60
Verde	3	728	86.67

Nota. Elaboración propia mediante la base de datos.

La Tabla 3 presenta un análisis descriptivo sobre la distribución de colores observados en las hojas de los explantes cultivados in vitro. Los datos muestran tres categorías principales: pardo, amarillo y verde, con una frecuencia total de 840 observaciones. El color predominante es el verde, con una frecuencia de 728 casos, lo que representa el 86.67% del total. Este resultado indica que la mayoría de los explantes desarrollaron hojas saludables, lo cual es un indicador positivo del estado fisiológico bajo las condiciones experimentales.

En contraste, los colores amarillo y pardo tienen frecuencias significativamente menores, con 89 casos (10.60%) y 23 casos (2.73%), respectivamente. Estas tonalidades están asociadas a las condiciones del cultivo, como desequilibrios en la concentración hormonal o variaciones en el medio de cultivo.

**Tabla 4**  
*Tabla de Frecuencia para Aspecto de Hojas*

<b>Clase</b>	<b>Valor</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
Deficiente	1	61	7.26
Regular	2	95	11.31
Bueno	3	684	81.43

Nota. Elaboración propia mediante la base de datos.

La Tabla 4 muestra la distribución de las categorías observadas en el aspecto foliar de los explantes cultivados in vitro. Se identifican tres clases principales: "Deficiente", "Regular" y "Bueno", con un total de 840 observaciones. La categoría predominante es "Bueno", con una frecuencia de 684 casos, lo que representa el 81.43% del total. Este resultado indica que la mayoría de los explantes desarrollaron hojas con características óptimas bajo las condiciones experimentales establecidas, lo cual es un indicador positivo del éxito del cultivo. En contraste, las categorías "Deficiente" y "Regular" tienen frecuencias significativamente menores, con 61 casos (7.26%) y 95 casos (11.31%), respectivamente. Estas clasificaciones pueden estar asociadas a factores limitantes en el medio de cultivo, como desequilibrios en las concentraciones hormonales y deficiencias nutricionales.

**Tabla 5**  
*Tabla de Frecuencia para Color de Tallo*

<b>Clase</b>	<b>Valor</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
Pardo	1	191	22.74
Amarillo	2	92	10.95
Verde	3	557	66.31

Nota. Elaboración propia mediante la base de datos.

La Tabla 5 presenta la distribución de colores observados en los tallos de los explantes cultivados in vitro. Los datos muestran tres categorías principales: pardo, amarillo y verde, con un total de 840 observaciones. El color predominante es el verde, con una frecuencia de 557 casos, lo que representa el 66.31% del total. Este resultado

indica que la mayoría de los explantes desarrollaron tallos saludables bajo las condiciones experimentales evaluadas, lo cual es un indicador positivo del estado fisiológico y la adaptación al medio de cultivo. En contraste, los colores pardo y amarillo tienen frecuencias menores, con 191 casos (22.74%) y 92 casos (10.95%), respectivamente.

**Tabla 6**  
*Tabla de Frecuencia para Aspecto de Planta*

<b>Clase</b>	<b>Valor</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
Débiles	1	53	6.31
Medianamente vigorosas	2	121	14.40
Vigorosas	3	666	79.29

Nota. Elaboración propia mediante la base de datos.

La Tabla 6 presenta un análisis descriptivo sobre la condición general de los explantes cultivados in vitro, clasificándolos en tres categorías: "Débiles", "Medianamente vigorosas" y "Vigorosas". Con un total de 840 observaciones, la categoría predominante es "Vigorosas", con una frecuencia de 666 casos, lo que representa el 79.29% del total. Este resultado indica que la mayoría de los explantes lograron desarrollar características óptimas bajo las condiciones experimentales, reflejando un éxito significativo en el establecimiento y desarrollo fisiológico. En contraste, las categorías "Débiles" y "Medianamente vigorosas" tienen frecuencias menores, con 53 casos (6.31%) y 121 casos (14.40%), respectivamente.

**Tabla 7**  
*Tabla de Frecuencia para Sobrevivientes*

<b>Clase</b>	<b>Valor</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
No sobrevive	0	170	20.24
Sobrevive	1	670	79.76

Nota. Elaboración propia mediante la base de datos.

La Tabla 7 presenta la distribución de los explantes según su capacidad de sobrevivencia bajo las condiciones del cultivo in vitro. Con un total de 840 observaciones, se identifican dos categorías: "No sobrevive" y "Sobrevive". La mayoría de los explantes, representando el 79.76% (670 casos), lograron sobrevivir, lo que refleja un éxito considerable en el establecimiento de los explantes en el sistema in vitro. Este resultado es un indicador positivo de la efectividad del cultivo de

tejidos vegetales como herramienta para la introducción y establecimiento de la frambuesa (*Rubus Idaeus* L.). Por otro lado, el 20.24% de los explantes (170 casos) no logró sobrevivir, lo que pone de manifiesto que existen factores limitantes en las condiciones experimentales que podrían estar afectando la viabilidad de algunos explantes.

## Análisis inferencial

**Objetivo general:** Determinar la eficiencia del cultivo de tejidos vegetales como herramienta para la introducción y establecimiento de la frambuesa (*Rubus Idaeus* L.) en el sistema in vitro.

**Tabla 8**

*Análisis de Varianza para Sobrevivientes - Suma de Cuadrados Tipo III*

Fuente	Suma de Cuadrados	de	Gl	Cuadrado Medio	Razó n-F	Valor-P
COVARIABLES						
Número de Hojas	0.364441		1	0.364441	5.65	0.0174
Color de Hojas	0.0214635		1	0.0214635	0.33	0.5639
Aspecto de Hojas	1.7631		1	1.7631	27.35	0.0000
Número de Brotes	0.011174		1	0.011174	0.17	0.6771
Longitud de Tallo	1.97856		1	1.97856	30.70	0.0000
Color de Tallo	1.25489		1	1.25489	19.47	0.0000
Aspecto de Planta	3.05744		1	3.05744	47.44	0.0000
EFECTOS PRINCIPALES						
A:Tipo y concentracion	5.40004		3	1.80001	27.93	0.0000
B:Concentracion	1.47538		2	0.73769	11.45	0.0000
M&S						
C:Tiempo	0.338885		6	0.0564809	0.88	0.5118
INTERACCIONES						
AB	2.62658		6	0.437764	6.79	0.0000
AC	0.330914		18	0.0183841	0.29	0.9986
BC	0.277928		12	0.0231607	0.36	0.9768
ABC	0.824148		36	0.022893	0.36	0.9999
RESIDUOS	48.2762		74	0.0644542		
			9			
TOTAL	135.595		83			
(CORREGIDO)			9			

*Nota.* Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La Tabla 8 permite evaluar la influencia de diversas covariables, efectos principales e interacciones sobre la tasa de sobrevivencia de los explantes de frambuesa (*Rubus Idaeus* L.) en el sistema in vitro. Este análisis tiene como objetivo determinar la eficiencia del cultivo de tejidos vegetales como herramienta para su introducción y establecimiento.

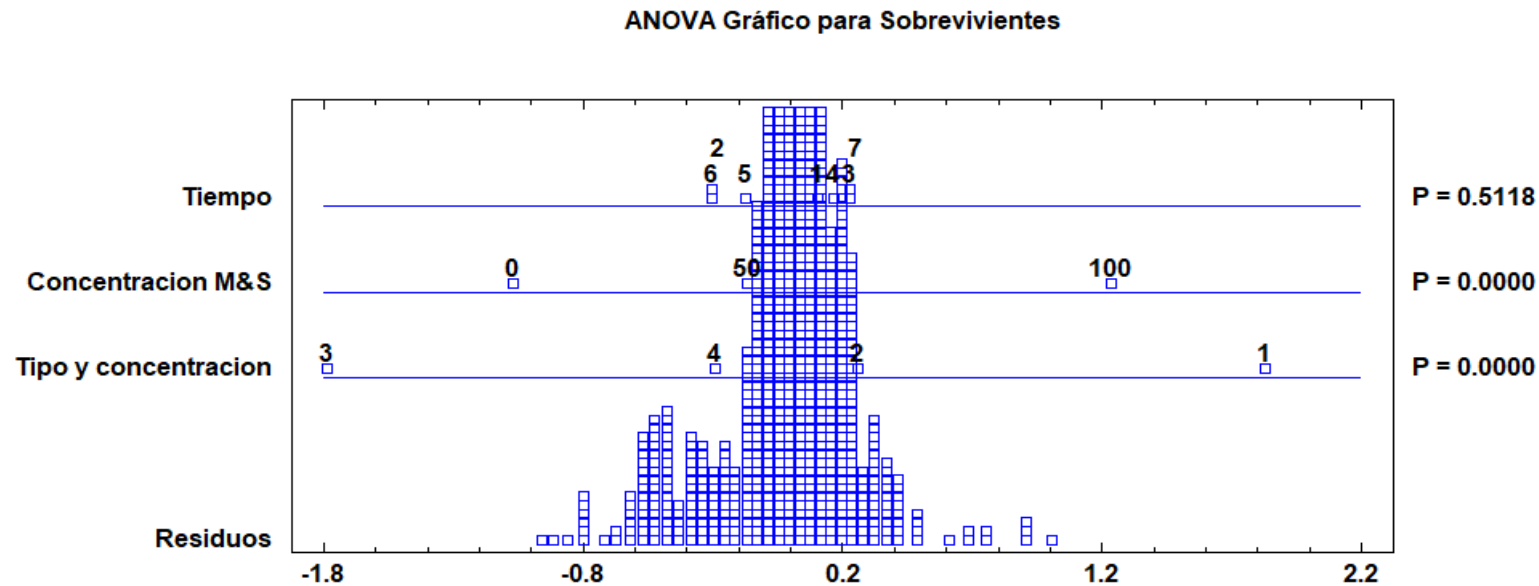
Las covariables analizadas muestran que el aspecto de hojas, la longitud de tallo, el color de tallo y el aspecto de planta tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la sobrevivencia, con valores-P menores a 0.05. Por ejemplo, el aspecto de planta presenta la mayor influencia, con una razón-F de 47.44 ( $P = 0.0000$ ), lo que indica que plantas vigorosas tienen una mayor probabilidad de sobrevivir. En contraste, variables como el número de brotes y el color de hojas no muestran una relación significativa ( $P > 0.05$ ), sugiriendo que estos factores no son determinantes para la sobrevivencia en las condiciones evaluadas.

Entre los efectos principales, el tipo y concentración hormonal (razón-F = 27.93,  $P = 0.0000$ ) y la concentración del medio MS (razón-F = 11.45,  $P = 0.0000$ ) tienen un impacto significativo en la tasa de sobrevivencia. Esto indica que las combinaciones hormonales y las concentraciones del medio son factores clave para optimizar el cultivo in vitro. Por otro lado, el tiempo no mostró un efecto significativo ( $P = 0.5118$ ), sugiriendo que las diferencias temporales entre los tratamientos no afectan considerablemente la sobrevivencia.

En cuanto a las interacciones, se observa una interacción significativa entre tipo y concentración hormonal y concentración MS (AB), con una razón-F de 6.79 ( $P = 0.0000$ ). Esto implica que la combinación adecuada de estos dos factores puede mejorar significativamente los resultados del cultivo in vitro. Sin embargo, otras interacciones como AC (tipo y tiempo) o BC (concentración MS y tiempo) no mostraron efectos significativos ( $P > 0.05$ ), lo que indica que estas combinaciones no son relevantes para explicar las variaciones en la sobrevivencia.

**Figura 1**

*Gráfico del Análisis de Varianza para Sobrevivientes*

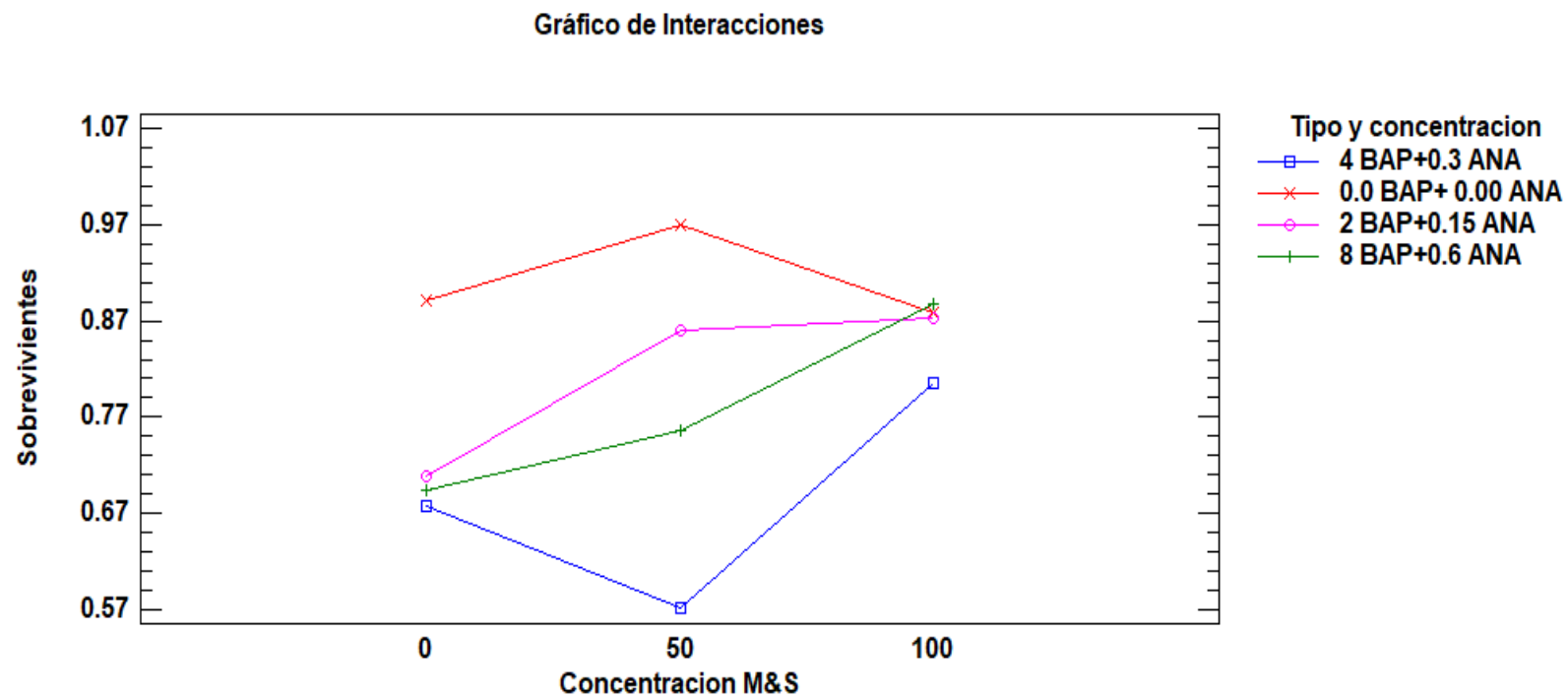


*Nota.* Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La figura 1 de interacciones refuerza estos hallazgos al mostrar cómo las combinaciones de tipo y concentración hormonal interactúan con la concentración del medio MS. Se observa que la combinación "0 BAP + 0 ANA" produce las tasas más altas de sobrevivencia, mientras que "4 BAP + 0.3 ANA" genera tasas más bajas. Esto sugiere que concentraciones más altas de BAP pueden ser menos efectivas para promover la sobrevivencia en comparación con concentraciones más bajas o nulas.

**Figura 2**

*Gráfico de Interacciones Significativas para Sobrevivientes*



Nota. Elaboración propia mediante la base de datos.



En la figura 2 en cuanto a las interacciones entre tipo y concentración hormonal y concentración del medio MS, se observa que la concentración más alta del medio MS (100%) tiende a mejorar la sobrevivencia en todas las combinaciones hormonales. Esto sugiere que una mayor disponibilidad de nutrientes en el medio puede mitigar parcialmente los efectos negativos de ciertas combinaciones hormonales.

**Tabla 9**

*Pruebas de Múltiple Rangos para Sobrevivientes por Tiempo: Método: 95.0 porcentaje LSD*

<b>Tiempo</b>	<b>Casos</b>	<b>Media LS</b>	<b>Sigma LS</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
6	120	0.77049	0.0232241	X
2	120	0.772927	0.0232657	X
5	120	0.782223	0.0232059	X
1	120	0.806759	0.0232369	X
4	120	0.812303	0.0232169	X
3	120	0.818207	0.0232144	X
7	120	0.820425	0.0232576	X
<b>Contraste</b>	<b>Sig.</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/- Límites</b>	
1 - 2		0.0338323	0.0644212	
1 - 3		-0.0114474	0.0643905	
1 - 4		-0.00554312	0.0644307	
1 - 5		0.0245368	0.0644191	
1 - 6		0.0362696	0.0644251	
1 - 7		-0.0136653	0.0644815	
2 - 3		-0.0452797	0.0643783	
2 - 4		-0.0393754	0.064426	
2 - 5		-0.00929543	0.0644832	
2 - 6		0.00243729	0.0645816	
2 - 7		-0.0474975	0.0645572	
3 - 4		0.00590432	0.0643436	
3 - 5		0.0359843	0.0643257	
3 - 6		0.047717	0.0644182	
3 - 7		-0.00221782	0.0644939	
4 - 5		0.03008	0.0642769	
4 - 6		0.0418127	0.0643936	
4 - 7		-0.00812214	0.0645031	
5 - 6		0.0117327	0.0643276	
5 - 7		-0.0382021	0.0644348	
6 - 7		-0.0499348	0.0642976	

Nota.\* indica una diferencia significativa.

La Tabla 9 analiza la variación en la tasa de sobrevivencia de los explantes de frambuesa (*Rubus Idaeus* L.) en función del tiempo de cultivo. Con un nivel de

confianza del 95%, se evalúan las diferencias entre las medias de los grupos y se identifican posibles relaciones significativas.

Los resultados muestran que los valores promedio de sobrevivencia oscilan entre 0.77049 (para la semana 6) y 0.820425 (para la semana 7). Aunque las medias varían ligeramente entre los tiempos, todos los grupos comparten el mismo grupo homogéneo ("X"), lo que indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Esto es respaldado por los contrastes, donde ninguna diferencia supera los límites establecidos para significancia, confirmando que el tiempo no tiene un impacto relevante sobre la tasa de sobrevivencia en este experimento.

**Tabla 10**

*Pruebas de Múltiple Rangos para Sobrevivientes por Concentración M&S:  
Método: 95.0 porcentaje LSD*

<b>Concentración M&amp;S</b>	<b>Casos</b>	<b>Media LS</b>	<b>Sigma LS</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
0	280	0.742425	0.0180093	X
50	280	0.789091	0.0165194	X
100	280	0.861341	0.0162574	X
<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>		<i>+/- Límites</i>
0 - 50		-0.0466665		0.0518542
0 - 100	*	-0.118917		0.050891
50 - 100	*	-0.0722504		0.0446878

Nota.\* indica una diferencia significativa.

En la Tabla 9 los resultados muestran medias crecientes de sobrevivencia a medida que aumenta la concentración del medio: 0.742425 para 0%, 0.789091 para 50%, y 0.861341 para 100%. Esto indica que una mayor concentración de nutrientes en el medio favorece la sobrevivencia de los explantes.

Los grupos homogéneos identificados en la tabla muestran que las concentraciones 0% y 50% comparten el mismo grupo ("X"), mientras que la concentración al 100% pertenece a un grupo diferente, lo que sugiere diferencias significativas entre las concentraciones más bajas y la más alta. Esto se confirma en los contrastes, donde las diferencias entre las concentraciones 0% y 100%, así como entre 50% y 100%, son estadísticamente significativas (\*), con valores-P menores a 0.05.

**Tabla 11**

*Pruebas de Múltiple Rangos para Sobrevivientes por Tipo y concentración: Método: 95.0 porcentaje LSD*

<b>Tipo y concentración</b>	<b>Casos</b>	<b>Media LS</b>	<b>Sigma LS</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>	
4 BAP+0.3 ANA	210	0.684418	0.0178152	X	
8 BAP+0.6 ANA	210	0.779017	0.01793	X	
2 BAP+0.15 ANA	210	0.813802	0.018332	X	
0.0 BAP+ 0.00 ANA	210	0.913239	0.0177177	X	
<i>Contraste</i>			<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
0.0 BAP+ 0.00 ANA - 2 BAP+0.15 ANA			*	0.0994364	0.0501564
0.0 BAP+ 0.00 ANA - 4 BAP+0.3 ANA			*	0.22882	0.0493837
0.0 BAP+ 0.00 ANA - 8 BAP+0.6 ANA			*	0.134222	0.0496204
2 BAP+0.15 ANA - 4 BAP+0.3 ANA			*	0.129384	0.0509981
2 BAP+0.15 ANA - 8 BAP+0.6 ANA				0.0347853	0.051385
4 BAP+0.3 ANA - 8 BAP+0.6 ANA			*	-0.0945984	0.0492981

Nota.\* indica una diferencia significativa.

La Tabla 11 muestra que las medias de sobrevivencia varían significativamente entre los tratamientos, con valores que oscilan desde 0.684418 para "4 BAP + 0.3 ANA" hasta 0.913239 para "0 BAP + 0 ANA".

El análisis revela que el tratamiento sin reguladores ("0 BAP + 0 ANA") presenta la mayor tasa de sobrevivencia, lo que sugiere que la ausencia de hormonas favorece la viabilidad de los explantes bajo las condiciones experimentales evaluadas. En contraste, el tratamiento con "4 BAP + 0.3 ANA" muestra la menor tasa de sobrevivencia, lo que indica que concentraciones altas de BAP pueden generar efectos adversos, posiblemente relacionados con estrés fisiológico o toxicidad.

Los contrastes entre las medias confirman diferencias estadísticamente significativas (\*), especialmente entre "0 BAP + 0 ANA" y los demás tratamientos hormonales. Por ejemplo, la diferencia entre "0 BAP + 0 ANA" y "4 BAP + 0.3 ANA" es notable (0.22882), lo que refuerza la idea de que concentraciones más altas de reguladores de crecimiento no son óptimas para la sobrevivencia en este sistema experimental.

**Objetivo específico 1** Evaluar las diferencias significativas en la tasa de regeneración de los explantes de frambuesa bajo diferentes condiciones de tipo y concentración de cultivo in vitro.

**Tabla 12**  
*Verificación de Varianza*

	<b>Prueba</b>	<b>Valor-P</b>
Levene's	0.46739	0.705849

Nota. Elaboración propia mediante la base de datos.

En este caso, el valor-P de 0.705849 indica que no hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula de igualdad de varianzas entre los grupos, lo que significa que las varianzas de las tasas de regeneración son homogéneas, cumpliendo con uno de los supuestos fundamentales para realizar un ANOVA.

**Tabla 13**  
*Tabla ANOVA para Tasa de regeneración por .Tipo y concentracion*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>de Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F calculado</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	87828.7	3	29276.2	0.47	0.7058
Intra grupos	5.01102E6	80	62637.8		
Total (Corr.)	5.09885E6	83			

Nota.\* indica una diferencia significativa.

La Tabla 13 proporcionan información crucial para evaluar las diferencias significativas en la tasa de regeneración de los explantes de frambuesa (*Rubus Idaeus* L.) bajo diferentes condiciones de cultivo in vitro. La prueba de Levene se utiliza para evaluar la homogeneidad de varianzas entre los grupos.

El ANOVA se emplea para determinar si existen diferencias significativas en las medias de la tasa de regeneración entre los diferentes tratamientos de tipo y concentración hormonal. Los resultados muestran que la suma de cuadrados entre grupos es 87828.7, con 3 grados de libertad, reflejando la variabilidad entre los tratamientos, mientras que la suma de cuadrados intra grupos es 5.01102E6, con 80 grados de libertad, representando la variabilidad dentro de cada tratamiento. El

cuadrado medio entre grupos es 29276.2, y el cuadrado medio intra grupos es 62637.8, lo que da una razón-F de 0.47. El valor-P de 0.7058 es mayor que el nivel de significancia comúnmente aceptado de 0.05, lo que sugiere que no hay diferencias significativas en la tasa de regeneración entre los diferentes tratamientos de tipo y concentración hormonal.

**Tabla 14**

*Pruebas de Múltiple Rangos para Tasa de regeneración por .Tipo y concentración:  
Método: 95.0 porcentaje LSD*

<b>Nivel</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
8 ppm BAP+0,6 ppm ANA	21	164.762	X
0,0 ppm BAP+ 0,00 ppm ANA	21	170.0	X
2 ppm BAP+0,15 ppm ANA	21	220.0	X
4 ppm BAP+0,3 ppm ANA	21	240.571	X
<b>Contraste</b>	<b>Sig.</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/- Límites</b>
4 ppm BAP+0,3 ppm ANA - 0,0 ppm BAP+ 0,00 ppm ANA		70.5714	153.706
4 ppm BAP+0,3 ppm ANA - 2 ppm BAP+0,15 ppm ANA		20.5714	153.706
4 ppm BAP+0,3 ppm ANA - 8 ppm BAP+0,6 ppm ANA		75.8095	153.706
0,0 ppm BAP+ 0,00 ppm ANA - 2 ppm BAP+0,15 ppm ANA		-50.0	153.706
0,0 ppm BAP+ 0,00 ppm ANA - 8 ppm BAP+0,6 ppm ANA		5.2381	153.706
2 ppm BAP+0,15 ppm ANA - 8 ppm BAP+0,6 ppm ANA		55.2381	153.706

Nota.\* indica una diferencia significativa.

La Tabla 14 evalúa las diferencias significativas en la tasa de regeneración de los explantes de frambuesa (*Rubus Idaeus* L.) bajo diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento (BAP y ANA) en el sistema in vitro. Los resultados muestran que las medias de regeneración varían entre los tratamientos, con valores que oscilan desde 164.762 para "8 ppm BAP + 0.6 ppm ANA" hasta 240.571 para "4 ppm BAP + 0.3 ppm ANA".

El análisis revela que todos los tratamientos hormonales comparten el mismo grupo homogéneo ("X"), lo que indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Esto se confirma en los contrastes, donde ninguna diferencia supera los límites establecidos para significancia, con valores-P mayores a 0.05. Por ejemplo, la

diferencia entre "4 ppm BAP + 0.3 ppm ANA" y "0 ppm BAP + 0 ppm ANA" es de 70.5714, pero no es significativa.

**Objetivo específico 2:** Evaluar las diferencias significativas en la tasa de regeneración de los explantes de frambuesa bajo diferentes condiciones de concentración de M&S de cultivo in vitro.

**Tabla 15**

*Verificación de Varianza*

	<b>Prueba</b>	<b>Valor-P</b>
Levene's	4.66017	0.0121431

Nota. Elaboración propia mediante la base de datos.

En este caso, el valor-P de 0.0121431 indica que hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula de igualdad de varianzas entre los grupos. Esto significa que las varianzas de las tasas de regeneración no son homogéneas, lo cual es un supuesto fundamental para realizar un ANOVA.

**Tabla 16**

*Tabla ANOVA para Tasa de regeneración por .Concentración M&S*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>de Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F calculado</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	498977.	2	249489.	4.39	0.0154
Intra grupos	4.59987E6	81	56788.5		
Total (Corr.)	5.09885E6	83			

Nota.\* indica una diferencia significativa.

La Tabla 16 revela diferencias estadísticamente significativas en la tasa de regeneración de explantes de frambuesa (*Rubus Idaeus* L.) bajo distintas concentraciones del medio Murashige y Skoog (M&S). El valor-P de 0.0154 (menor al nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ ) indica que las concentraciones evaluadas del medio M&S influyen significativamente en la respuesta regenerativa de los explantes. La suma de cuadrados entre grupos (498977) y la razón-F de 4.39 reflejan una variabilidad sustancial atribuible a las concentraciones del medio, superando la variabilidad intra grupos (intra grupos = 4.59987E6).

**Tabla 17**

*Pruebas de Múltiple Rangos para Tasa de regeneración por Concentración M&S:  
Método: 95.0 porcentaje LSD*

<b>Nivel</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
0	28	100.714	X
100	28	206.786	XX
50	28	289.0	X
<b>Contraste</b>	<b>Sig.</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/- Límites</b>
0 - 50	*	-188.286	126.722
0 - 100		-106.071	126.722
50 - 100		82.2143	126.722

Nota.\* indica una diferencia significativa.

La Tabla 17 muestra que las tasas de regeneración de los explantes de frambuesa (*Rubus Idaeus* L.) varían significativamente según la concentración del medio Murashige y Skoog (M&S). La concentración al 50% presenta la media más alta (289.0), seguida por el 100% (206.786) y el 0% (100.714). Se detecta una diferencia estadísticamente significativa (\*) entre las concentraciones 0% y 50% (diferencia = -188.286,  $p < 0.05$ ), lo que indica que la ausencia de nutrientes en el medio limita considerablemente la regeneración. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones 0% y 100% ni entre 50% y 100%, lo que sugiere que, aunque el 50% es óptimo, aumentar al 100% no mejora sustancialmente la tasa de regeneración. Estos resultados destacan la importancia de una concentración moderada del medio M&S para maximizar la eficiencia regenerativa en sistemas in vitro.

**Objetivo específico 3:** Determinar la relación entre las concentraciones de hormonas de crecimiento y la proliferación de tejidos de frambuesa.

**Tabla 18**

*Análisis de Varianza para Número de Brotes - Suma de Cuadrados Tipo III*

<b>Fuente</b>		<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>de Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F calculado</b>	<b>Valor-P</b>
EFFECTOS PRINCIPALES						
A:Tipo concentración	y	50.7905	3	16.9302	9.63	0.0000
B:Concentracion M&S		257.088	2	128.544	73.08	0.0000
INTERACCIONES						
AB		79.4738	6	13.2456	7.53	0.0000
RESIDUOS		1456.34	828	1.75887		
TOTAL (CORREGIDO)		1843.7	839			

Nota. Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La Tabla 18 revela que tanto el tipo y concentración hormonal (A) como la concentración del medio M&S (B) tienen efectos estadísticamente significativos sobre la proliferación de brotes en explantes de frambuesa (*Rubus Idaeus* L.), con valores-P de 0.0000. La interacción AB (tipo hormonal × concentración M&S) también es significativa ( $P = 0.0000$ ), lo que indica que el efecto de las hormonas sobre la proliferación depende de la concentración del medio utilizado. El factor B muestra la mayor influencia, con una suma de cuadrados de 257.088 frente a 50.7905 del factor A, lo que sugiere que la composición del medio M&S es el principal determinante de la respuesta proliferativa. Estos resultados coinciden con estudios en *Rubus* spp., donde la sinergia entre auxinas (ej. ANA) y citoquininas (ej. BAP) en medios enriquecidos potencia la formación de brotes, aunque su eficacia varía según la concentración de sales del medio. Por ejemplo, en frambuesa 'Heritage', combinaciones de 2 mg/L BAP y 0.1 mg/L ANA en medio M&S al 50% generan hasta 8 brotes por explante, mientras que concentraciones más altas inducen hiperhidricidad. La interacción significativa AB refuerza la necesidad de optimizar ambos parámetros simultáneamente para maximizar la proliferación, un principio clave en protocolos de micropropagación de frutales leñosos.



**Tabla 19**

*Pruebas de Múltiple Rangos para Número de Brotes por Tipo y concentración:*  
*Método: 95.0 porcentaje LSD*

<b>Tipo y concentración</b>	<b>Casos</b>	<b>Media LS</b>	<b>Sigma LS</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>	
4 BAP+0.3 ANA	210	1.57619	0.0915181	X	
8 BAP+0.6 ANA	210	1.64762	0.0915181	X	
0.0 BAP+ 0.00 ANA	210	1.7	0.0915181	X	
2 BAP+0.15 ANA	210	2.2	0.0915181	X	
<b>Contraste</b>			<b>Sig.</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/- Límites</b>
0.0 BAP+ 0.00 ANA - 2 BAP+0.15 ANA			*	-0.5	0.253671
0.0 BAP+ 0.00 ANA - 4 BAP+0.3 ANA				0.12381	0.253671
0.0 BAP+ 0.00 ANA - 8 BAP+0.6 ANA				0.052381	0.253671
2 BAP+0.15 ANA - 4 BAP+0.3 ANA			*	0.62381	0.253671
2 BAP+0.15 ANA - 8 BAP+0.6 ANA			*	0.552381	0.253671
4 BAP+0.3 ANA - 8 BAP+0.6 ANA				-0.0714286	0.253671

Nota. \* indica una diferencia significativa.

La Tabla 19 evidencia diferencias significativas en la proliferación de brotes de frambuesa (*Rubus Idaeus* L.) bajo distintas combinaciones hormonales. El tratamiento 2 BAP + 0.15 ANA registró la media más alta (2.2 brotes), clasificándose en un grupo homogéneo distinto (X), lo que indica su superioridad estadística frente a otras combinaciones. En contraste, las concentraciones 0 BAP + 0 ANA (1.7), 4 BAP + 0.3 ANA (1.58) y 8 BAP + 0.6 ANA (1.65) no mostraron diferencias significativas entre sí, agrupándose en el mismo conjunto (X). Los contrastes revelaron diferencias significativas (\*) entre 0 BAP + 0 ANA vs. 2 BAP + 0.15 ANA (-0.5) y entre 2 BAP + 0.15 ANA vs. 4 BAP + 0.3 ANA (0.62) y 2 BAP + 0.15 ANA vs. 8 BAP + 0.6 ANA (0.55), lo que sugiere que concentraciones moderadas de BAP (ej. 2 mg/L) son más efectivas para inducir brotes, mientras que dosis altas (4-8 mg/L) o la ausencia hormonal reducen la eficiencia.

**Tabla 20**

*Pruebas de Múltiple Rangos para Número de Brotes por Concentración M&S: Método: 95.0 porcentaje LSD*

<b>Concentración M&amp;S</b>	<b>Casos</b>	<b>Media LS</b>	<b>Sigma LS</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
0	280	1.00714	0.079257	X
100	280	2.06786	0.079257	X
50	280	2.26786	0.079257	X
<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>		<i>+/- Límites</i>
0 - 50	*	-1.26071		0.219686
0 - 100	*	-1.06071		0.219686
50 - 100		0.2		0.219686

Nota. \* indica una diferencia significativa.

La Tabla 20: muestra diferencias significativas en la proliferación de brotes de frambuesa (*Rubus Idaeus* L.) según la concentración del medio Murashige y Skoog (M&S). La concentración al 50% registró la media más alta (2.27 brotes), seguida por el 100% (2.07) y el 0% (1.01). Los contrastes revelaron diferencias estadísticamente significativas (\*) entre 0% y 50% (diferencia = -1.26) y 0% y 100% (-1.06), lo que indica que la ausencia de nutrientes (0%) limita drásticamente la proliferación, mientras que concentraciones moderadas (50%) u altas (100%) del medio M&S favorecen significativamente la formación de brotes. Sin embargo, no se detectaron diferencias entre 50% y 100% (diferencia = 0.2), sugiriendo que aumentar la concentración más allá del 50% no mejora sustancialmente la respuesta proliferativa.

## 4.2 Discusión

El cultivo de tejidos vegetales ha demostrado ser una herramienta eficiente para la introducción y establecimiento de la frambuesa (*Rubus Idaeus* L.) en sistemas in vitro. Los resultados obtenidos en este estudio indican que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, es posible obtener una alta tasa de sobrevivencia y regeneración de explantes, lo que facilita la producción de plantas sanas y libres de enfermedades. La optimización de factores como la concentración del medio Murashige y Skoog (M&S), las combinaciones hormonales y la selección de explantes adecuados son cruciales para maximizar la eficiencia del sistema in vitro. Estos hallazgos proporcionan una base sólida para futuros estudios y aplicaciones prácticas en la micropropagación de frambuesa, contribuyendo a la mejora de la producción agrícola y la conservación de germoplasma.

Este estudio coincide con los hallazgos de Wang et al. (2005), quienes desarrollaron un procedimiento de criopreservación para brotes in vitro de frambuesa, destacando la importancia de optimizar las condiciones de cultivo para maximizar la eficiencia del sistema in vitro. Ambos estudios reconocen la relevancia de las técnicas de cultivo in vitro para la conservación y propagación de frambuesa, subrayando la necesidad de ajustar factores como la concentración del medio y las condiciones hormonales. Además, Wang y Valkonen (2009) también exploraron la optimización de la crioconservación, aunque su enfoque fue la eliminación de patógenos virales, lo que subraya la versatilidad del cultivo in vitro para diferentes objetivos. La optimización de las condiciones de cultivo es un principio común en ambos estudios, ya que se busca maximizar la eficiencia del sistema in vitro, ya sea para la conservación a largo plazo o para la producción de plantas sanas y libres de enfermedades.

Mientras que Wang et al. (2005) se centraron en la conservación a largo plazo del germoplasma, este estudio se enfoca en la regeneración y proliferación de tejidos para la producción de plantas sanas y libres de enfermedades. La metodología de Wang et al. (2005) incluye técnicas de encapsulación-vitrificación y encapsulación-deseccación, que son métodos específicos para la criopreservación, mientras que este estudio evalúa la influencia de diferentes concentraciones hormonales y del medio M&S en la regeneración y proliferación de tejidos. Además, Wang y Valkonen (2009) utilizaron termoterapia y suplementos de hierro para mejorar la recuperación de brotes, lo que no se abordó en este estudio, ya que su enfoque fue la eliminación de patógenos virales, un objetivo diferente al de la regeneración y proliferación de tejidos.

El análisis inferencial reveló que no existen diferencias significativas en la tasa de regeneración de los explantes de frambuesa (*Rubus Idaeus* L.) bajo las diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento (BAP y ANA) evaluadas. Esto sugiere que las variaciones en la tasa de regeneración pueden ser atribuidas a la variabilidad aleatoria y no a los efectos de los tratamientos hormonales. Por lo tanto, bajo las condiciones experimentales evaluadas, las concentraciones hormonales no tienen un impacto significativo en la tasa de regeneración de los explantes de frambuesa. Estos hallazgos indican que otros factores, como la composición del medio de cultivo o las

condiciones ambientales, podrían tener un impacto más significativo en la regeneración de los explantes.

Este resultado contrasta con los hallazgos de Nam et al. (2016), quienes encontraron que la citocinina TDZ y 4-PU eran más efectivas que el 6-BAP para la micropropagación de frambuesa. Ambos estudios buscan optimizar la regeneración y proliferación de tejidos de frambuesa mediante el uso de reguladores de crecimiento, lo que subraya la importancia de las citocininas en la inducción de brotes. Además, Georgieva et al. (2004) también exploraron la respuesta de frambuesa a estrés osmótico, lo que sugiere que la selección de genotipos tolerantes puede influir en la eficiencia del cultivo in vitro. La relevancia de las citocininas en la inducción de brotes es un punto común en ambos estudios, aunque los resultados difieren en cuanto a la eficacia de las diferentes citocininas evaluadas.

Nam et al. (2016) encontraron diferencias significativas entre las citocininas evaluadas, mientras que este estudio no detectó diferencias significativas. La metodología de Nam et al. (2016) incluyó la evaluación de TDZ y 4-PU, que son citocininas diferentes a las utilizadas en este estudio (BAP y ANA). Además, Georgieva et al. (2004) utilizaron PEG para simular sequía, lo que no se abordó en este estudio, ya que su enfoque fue la respuesta a estrés osmótico y la selección de genotipos tolerantes, un objetivo diferente al de la optimización de la regeneración y proliferación de tejidos. La ausencia de diferencias significativas en este estudio sugiere que otros factores, como la composición del medio de cultivo o las condiciones ambientales, podrían tener un impacto más significativo en la regeneración de los explantes, lo que no se exploró en los estudios citados.

Se encontraron diferencias significativas en la tasa de regeneración de los explantes de frambuesa bajo distintas concentraciones del medio Murashige y Skoog (M&S). La concentración al 50% del medio M&S demostró ser la más efectiva para maximizar la regeneración, con una media significativamente superior a la concentración al 0%, aunque no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones al 50% y al 100%. Esto sugiere que, aunque la concentración al 50% es óptima, aumentar al 100% no mejora sustancialmente la tasa de regeneración. Estos resultados destacan

la importancia de una concentración moderada del medio M&S para optimizar la eficiencia regenerativa en sistemas in vitro.

Este estudio coincide con los hallazgos de Georgieva et al. (2016), quienes también observaron que la concentración del medio MS influye en la proliferación de brotes en frambuesa. Ambos estudios reconocen la importancia de la concentración del medio MS en la respuesta regenerativa de los explantes de frambuesa, subrayando la necesidad de optimizar este factor para maximizar la eficiencia del cultivo in vitro. Además, Mallery et al. (2007) exploraron la estabilidad de antocianinas en frambuesas negras, lo que sugiere que la calidad nutracéutica de los frutos puede ser influenciada por las condiciones de cultivo, un aspecto que también se relaciona con la optimización del medio de cultivo.

Mientras que Georgieva et al. (2016) evaluaron la actividad antioxidante de los frutos, este estudio se centró en la optimización de la regeneración. La metodología de Georgieva et al. (2016) incluyó la adición de IBA, BAP y GA, mientras que este estudio evaluó diferentes concentraciones de M&S, lo que sugiere que la composición del medio puede influir en diferentes aspectos del cultivo in vitro. Además, Mallery et al. (2007) no abordaron la regeneración de tejidos, sino la absorción de antocianinas en tejidos orales, un enfoque diferente al de este estudio. La concentración al 50% del medio M&S demostró ser la más efectiva para la regeneración, mientras que en el estudio de Georgieva et al. (2016) se observó una variabilidad en la actividad antioxidante de los frutos en función de la especie y el tratamiento, lo que sugiere que la optimización del medio puede tener efectos diferentes en distintas etapas del cultivo in vitro.

El análisis de varianza (ANOVA) y las pruebas de múltiples rangos revelaron que tanto el tipo y concentración hormonal como la concentración del medio M&S tienen efectos significativos sobre la proliferación de brotes en explantes de frambuesa. La interacción entre estos factores también es significativa, indicando que la eficacia de las hormonas en la proliferación depende de la concentración del medio utilizado. La concentración al 50% del medio M&S, combinada con una concentración moderada de BAP (2 mg/L), demostró ser la más efectiva para inducir la proliferación de brotes,

mientras que concentraciones más altas de BAP o la ausencia de hormonas redujeron la eficiencia. Estos hallazgos refuerzan la necesidad de optimizar simultáneamente las concentraciones hormonales y del medio M&S para maximizar la proliferación de tejidos de frambuesa en sistemas in vitro.

Este estudio coincide con los hallazgos de Nam et al. (2016), quienes observaron que la eficacia de las citocininas en la proliferación depende de la concentración del medio utilizado. Ambos estudios reconocen la importancia de la interacción entre las concentraciones hormonales y del medio en la proliferación de brotes, subrayando la necesidad de un enfoque integral en la optimización de los protocolos de cultivo. Además, Mohammadsadeghi et al. (2023) exploraron la inhibición de la tirosinasa mediante derivados sintéticos de tirosol y cetona de frambuesa, lo que sugiere que la manipulación de compuestos bioactivos puede influir en la respuesta fisiológica de los tejidos, un principio que también se aplica en la optimización de las condiciones hormonales y del medio.

Mientras que Nam et al. (2016) encontraron diferencias significativas entre las citocininas evaluadas, este estudio no detectó diferencias significativas. La metodología de Nam et al. (2016) incluyó la evaluación de TDZ y 4-PU, que son citocininas diferentes a las utilizadas en este estudio (BAP y ANA). Además, Mohammadsadeghi et al. (2023) no abordaron la proliferación de tejidos, sino la inhibición de la melanogénesis, un enfoque diferente al de este estudio. La interacción significativa entre las concentraciones hormonales y del medio M&S sugiere que la optimización de estos factores es crucial para maximizar la eficiencia del cultivo in vitro, aunque los resultados difieren en cuanto a la eficacia de las diferentes citocininas evaluadas.

## **CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **4.1 Conclusiones**

El cultivo de tejidos vegetales se consolidó como una técnica biotecnológica eficaz para la introducción y establecimiento in vitro de frambuesa (*Rubus idaeus* L.), alcanzando una sobrevivencia del 79.76 % (670/840 explantes). Además, se obtuvo un 81.43 % de hojas con aspecto Bueno y un 79.29 % de plantas vigorosas, lo que confirma que las condiciones experimentales optimizadas permiten generar plantas sanas y libres de enfermedades.

La eficiencia del cultivo in vitro dependió de la optimización de parámetros como la concentración del medio Murashige y Skoog (M&S), las combinaciones hormonales y la selección de explantes. El tipo y concentración hormonal influyó significativamente en la sobrevivencia (razón-F = 27.93,  $P = 0.0000$ ), al igual que la concentración del medio M&S (razón-F = 11.45,  $P = 0.0000$ ). La interacción entre ambos factores también fue significativa (razón-F = 6.79,  $P = 0.0000$ ). La alta variabilidad en el número de hojas (CV = 135.58 %) y brotes (CV = 83.23 %) evidencia la necesidad de estandarizar estos factores para lograr protocolos consistentes y escalables.

No se encontraron diferencias significativas en la tasa de regeneración de explantes bajo las combinaciones hormonales evaluadas (BAP y ANA), según el ANOVA (razón-F = 0.47,  $P = 0.7058$ ). Las medias oscilaron entre 164.76 (8 ppm BAP + 0.6 ppm ANA) y 240.57 (4 ppm BAP + 0.3 ppm ANA), pero todas las combinaciones pertenecieron al mismo grupo homogéneo, indicando que las concentraciones hormonales no afectaron de manera significativa la regeneración.

La concentración al 50 % del medio M&S fue la más efectiva para la regeneración, con una media de 289.0, significativamente superior al 0 % (100.71,  $P < 0.05$ ), aunque sin diferencias frente al 100 % (206.79). Esto demuestra que concentraciones superiores al 50 % no mejoran sustancialmente la regeneración, como confirma el ANOVA (razón-F = 4.39,  $P = 0.0154$ ). La proliferación de brotes dependió de la

interacción entre hormonas y concentración del medio (razón-F = 7.53, P = 0.0000). La mejor combinación fue 2 mg/L BAP + 0.15 mg/L ANA con 50 % M&S, con una media de 2.2 brotes, superando a otras como 4 BAP + 0.3 ANA (1.58) y 8 BAP + 0.6 ANA (1.65). La ausencia de hormonas y concentraciones elevadas de BAP redujeron la eficiencia, posiblemente por desbalances hormonales o estrés fisiológico.

## **4.2 Recomendaciones**

Se recomienda desarrollar un protocolo estandarizado que priorice el uso de explantes saludables y condiciones de cultivo optimizadas. El estudio demostró que el cultivo de tejidos produjo plantas vigorosas con alta sobrevivencia y hojas saludables, lo que destaca su potencial para generar plantas libres de enfermedades. Para avanzar, se deben realizar pruebas de adaptación de estas plantas in vitro a condiciones de invernadero o campo, asegurando que mantengan su vigor y salud. La colaboración con agrónomos y fitomejoradores puede ayudar a integrar este protocolo en la producción comercial de frambuesa, apoyando la agricultura sostenible y la conservación del germoplasma.

Se recomienda explorar reguladores de crecimiento adicionales, como ácido indolbutírico (AIB) o tiodiazurón (TDZ), junto con las combinaciones de BAP y ANA evaluadas. El estudio mostró que las variaciones hormonales no tuvieron un efecto significativo en la regeneración, lo que sugiere que otros factores podrían ser más determinantes. Incorporar suplementos como vitaminas o aminoácidos al medio de cultivo podría mejorar la eficiencia de regeneración. Además, estudiar la expresión génica relacionada con los procesos de regeneración puede ofrecer información clave para optimizar los tratamientos hormonales, permitiendo desarrollar protocolos más efectivos para producir plántulas robustas de frambuesa.

Se recomienda adoptar una concentración del 50% de M&S como estándar, ya que demostró ser altamente efectiva para promover la regeneración. El estudio indicó que esta concentración favoreció un fuerte desarrollo de los explantes, mientras que concentraciones más altas no aportaron beneficios adicionales. Se deben realizar ensayos adicionales para evaluar el desempeño de las plantas cultivadas en este medio durante la aclimatación a condiciones externas, enfocándose en su crecimiento y sobrevivencia. Evaluar la relación costo-beneficio de usar el 50% de M&S también



puede garantizar la viabilidad económica de los protocolos para la micropropagación a gran escala.

Se recomienda priorizar concentraciones hormonales moderadas, como la combinación de BAP y ANA que mostró mejores resultados en la producción de nuevos brotes. El estudio destacó que ciertas combinaciones hormonales fueron más efectivas cuando se combinaron con un medio optimizado, indicando un efecto sinérgico. Se sugiere experimentar con dosis más bajas de hormonas y otros reguladores de crecimiento para evitar posibles efectos negativos de concentraciones altas. Además, verificar la estabilidad genética de los brotes proliferados mediante marcadores moleculares asegurará la calidad y confiabilidad de las plantas producidas para fines comerciales o de mejoramiento genético.

## CAPITULO VI: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alizadeh, M., Dabbagh, M., Badeli, S., & Kia, M. (2023). In vitro responses of raspberry plantlets to the culture media enriched with some plant sprout powders. *International Journal of Minor Fruits, Medicinal and Aromatic Plants*, 9(1), 60–67. doi:10.53552/ijmfmap.9.1.2023.60-67
- Anastacio-Ángel, G., González-Fuentes, J. A., Zermeño-González, A., Robledo-Olivo, A., Lara-Reimers, E. A., & Peña-Ramos, F. M. (2024). Efecto de bioestimulantes en crecimiento, fisiología y calidad bioquímica de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) sometida a estrés hídrico. *Terra Latinoamericana*, 42, e1772. <https://doi.org/10.28940/terra.v42i0.1772>
- Bilavcik, A., Hammond, S. D. H., Franova, J., Koloniuk, I., Hamborg, Z., Blystad, D.-R., Zamecnik, J. (2024). Elimination of Black raspberry necrosis virus from raspberry (*Rubus idaeus* L.) by in vitro cryotherapy. *European Journal of Horticultural Science*, 89(3), 1–6. doi:10.17660/eJHS.2024/016
- Cefali, L. C., Franco, J. G., Nicolini, G. F., Ataide, J. A., & Mazzola, P. G. (2019). In vitro antioxidant activity and solar protection factor of blackberry and raspberry extracts in topical formulation. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 18(2), 539–544. doi:10.1111/jocd.12842
- Chan, Y.-T., Huang, J., Wong, H.-C., Li, J., & Zhao, D. (2023). Metabolic fate of black raspberry polyphenols in association with gut microbiota of different origins in vitro. *Food Chemistry*, 404. doi:10.1016/j.foodchem.2022.134644
- Coates, E. M., Popa, G., Gill, C. I. R., McCann, M. J., McDougall, G. J., Stewart, D., & Rowland, I. (2007). Colon-available raspberry polyphenols exhibit anti-cancer effects on in vitro models of colon cancer. *Journal of Carcinogenesis*, 6. doi:10.1186/1477-3163-6-4
- Desai, K. G. H., Olsen, K. F., Mallery, S. R., Stoner, G. D., & Schwendeman, S. P. (2010). Formulation and in vitro-in vivo evaluation of black raspberry extract-loaded PLGA/PLA injectable millicylindrical implants for sustained delivery of chemopreventive

- anthocyanins. *Pharmaceutical Research*, 27(4), 628–643. doi:10.1007/s11095-009-0038-5
- Eskra, J. N., Dodge, A., Schlicht, M. J., & Bosland, M. C. (2020). Effects of Black Raspberries and Their Constituents on Rat Prostate Carcinogenesis and Human Prostate Cancer Cell Growth In Vitro. *Nutrition and Cancer*, 72(4), 672–685. doi:10.1080/01635581.2019.1650943
- Georgieva, M., Badjakov, I., Dincheva, I., Yancheva, S., & Kondakova, V. (2016). In vitro propagation of wild Bulgarian small berry fruits (Bilberry, lingonberry, raspberry and strawberry). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 22(1), 46–51. Retrieved from <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84959373020&partnerID=40&md5=deafee432b9362ec736431170d303e93>
- Georgieva, M., Djilianov, D., Konstantinova, T., & Parvanova, D. (2004). Screening of bulgarian raspberry cultivars and elites for osmotic tolerance in vitro. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 18(2), 95–98. doi:10.1080/13102818.2004.10817093
- Gledovic, A., Lezaic, A. J., Krstonosic, V., Djokovic, J., Nikolic, I., Bajuk-Bogdanovic, D., ... Savic, S. D. (2020). Low-energy nanoemulsions as carriers for red raspberry seed oil: Formulation approach based on Raman spectroscopy and textural analysis, physicochemical properties, stability and in vitro antioxidant/ biological activity. *PLoS ONE*, 15(4). doi:10.1371/journal.pone.0230993
- González-Barrio, R., Edwards, C. A., & Crozier, A. (2011). Colonic catabolism of ellagitannins, ellagic acid, and raspberry anthocyanins: In vivo and in vitro studies. *Drug Metabolism and Disposition*, 39(9), 1680–1688. doi:10.1124/dmd.111.039651
- Jones Castro, F., & Flores Mora, D. (2007). Establecimiento in vitro y pruebas preliminares de micropropagación en medio semisólido y líquido de frambuesa (*Rubus idaeus* L.). *Tecnología en Marcha*, 20(3), 46-54. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4835840>
- Mahadevan, B., Mata, J. E., Albershardt, D. J., Stevens, J. F., Pereira, C. B., Rodriguez-Proteau, R., & Baird, W. M. (2005). The effects of red raspberry extract on PAH transport across Calu-3 cell monolayer, an in vitro cell model. *International Journal of Cancer Prevention*, 2(2), 129–141. Retrieved from

<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-35448951815&partnerID=40&md5=0edbe3b85a3e3d24b9c15b7ec2924c52>

- Mallery, S. R., Stoner, G. D., Larsen, P. E., Fields, H. W., Rodrigo, K. A., Schwartz, S. J., ... Mumper, R. J. (2007). Formulation and in-vitro and in-vivo evaluation of a mucoadhesive gel containing freeze dried black raspberries: Implications for oral cancer chemoprevention. *Pharmaceutical Research*, 24(4), 728–737. doi:10.1007/s11095-006-9192-1
- McDougall, G. J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., & Stewart, D. (2005). Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), 5896–5904. doi:10.1021/jf050131p
- Mohammadsadeghi, N., Mahdavi, A., Saadati, F., & Mohammadi, F. (2023). In silico and in vitro studies of novel derivatives of tyrosol and raspberry ketone as the mushroom tyrosinase inhibitors. *Food Chemistry*, 424. doi:10.1016/j.foodchem.2023.136413
- Nam, I. Y. G., Zayakin, V. V., & Kondrashova, Y. F. (2016). TDZ and 4-PU are effective cytokinins for clonal micropropagation in vitro of different genotypes of everbearing raspberry. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 7(2), 878–882. Retrieved from <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84962483342&partnerID=40&md5=abbb1302528254886b4706b7c59a11f4>
- Ramírez-Mosqueda, M. A., Bello-Bello, J. J., & Vázquez-García, L. M. (2020). Silver nanoparticles enhance the organogenesis of *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 140, 511–519. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01731-1>
- Rojas-Vera, J., Patel, A. V., & Dacke, C. G. (2002). Relaxant activity of raspberry (*Rubus idaeus*) leaf extract in guinea-pig ileum in vitro. *Phytotherapy Research*, 16(7), 665–668. doi:10.1002/ptr.1040
- Ryan, T., Wilkinson, J. M., & Cavanagh, H. M. A. (2001). Antibacterial activity of raspberry cordial in vitro. *Research in Veterinary Science*, 71(3), 155–159. doi:10.1053/rvsc.2001.0502
- Sapieha-Waszkiewicz, A., Marjańska-Cichoń, B., & Miętkiewski, R. (2011). Effect of biopesticides on the growth and development of isolates of *botrytis cinerea* pers., in

- vitro obtained from raspberry plants. *Journal of Plant Protection Research*, 51(2), 151–156. doi:10.2478/v10045-011-0026-8
- Sarmast, M. K., & Salehi, H. (2016). Silver nanoparticles: An influential element in plant nanobiotechnology. *Molecular Biotechnology*, 58, 441–449. <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9943-4>
- Shi, C., Chen, X., Li, R., Wang, Y., & Xie, C. (2023). Effects of in Vitro Simulated Gastrointestinal Digestion on Antioxidant Components and Activity of Raspberry; [体外模拟胃肠消化对覆盆子抗氧化成分及其活性的影响]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 23(2), 83–90. doi:10.16429/j.1009-7848.2023.02.008
- Shi, H., Zhou, X., He, X., Ding, R., Wang, R., Wang, W., & Zhou, W. (2021). Extraction optimization of raspberry proanthocyanidins and determination of its antioxidant activities in vitro. *Food and Agricultural Immunology*, 32(1), 693–712. doi:10.1080/09540105.2021.1968799
- Simonovic, M., Kojic, V., Jakimov, D., Glumac, M., & Pejin, B. (2021). Raspberry seeds extract selectively inhibits the growth of human lung cancer cells in vitro. *Natural Product Research*, 35(13), 2253–2256. doi:10.1080/14786419.2019.1666391
- Tomas, M. (2022). Effect of dietary fiber addition on the content and in vitro bioaccessibility of antioxidants in red raspberry puree. *Food Chemistry*, 375. doi:10.1016/j.foodchem.2021.131897
- Vilchez, J., Castillo, J., & García, M. (2015). Medios de cultivo líquidos: un avance para la micropropagación comercial de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 45-53. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.52264>
- Wang, Q., & Valkonen, J. P. T. (2009). Improved recovery of cryotherapy-treated shoot tips following thermotherapy of in vitro-grown stock shoots of raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Cryo-Letters*, 30(3), 171–182. Retrieved from <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-68849091013&partnerID=40&md5=3e32de93726124faf0562322c497b7f9>
- Wang, Q., Laamanen, J., Uosukainen, M., & Valkonen, J. P. T. (2005). Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and

encapsulation-dehydration. *Plant Cell Reports*, 24(5), 280–288. doi:10.1007/s00299-005-0936-x

Zheng, J., Pistilli, M. J., Holloway, A. C., & Crankshaw, D. J. (2010). The effects of commercial preparations of red raspberry leaf on the contractility of the rat's uterus in vitro. *Reproductive Sciences*, 17(5), 494–501. doi:10.1177/1933719109359703

## CAPITULO VII: ANEXOS

### ANEXO N° 01. Operacionalización de variables

Variable independiente:

Variable	Definición	Indicadores
1.- Concentración de macro y micronutrientes en el medio de cultivo.	<p>El objetivo en la preparación de un medio de cultivo es suministrar los nutrimentos minerales en concentraciones adecuadas. Se deben incluir los macro elementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca, y Mg) y los micro elementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe, Cl); además, existe evidencia de que se debería añadirse níquel en la lista (Eskew et al., 1984).</p> <p>En su forma soluble, todos los elementos, ya sea libres o unidos de manera estructural a algún compuesto esencial, realizan otra función al contribuir a los potenciales osmóticos y por ello, ayudan a desarrollar la presión turgente necesaria para conservar la forma y la velocidad del crecimiento (Salisbury et al., 2000).</p> <p>La mayoría de los micronutrientes son esenciales, especialmente porque activan enzimas (Rob y Peirpont, 1983).</p> <p>Se ha diseñado un gran número de formulaciones útiles de soluciones de nutrientes a partir de estudios sobre la composición de las plantas y de otros estudios en los que se administraron diferentes concentraciones de los elementos a plantas en crecimiento (Salisbury, F; Ross,C, 2000).</p>	Crecimiento y desarrollo de plantas (cm/semana).

	<p>Salisbury, F &amp; Ross, C., (2000); indica que, aunque los contenidos de nitrógeno y azufre son similares en la hoja de maíz, existen algunas diferencias sustanciales en cuanto a la cantidad de fosforo, potasio y calcio. Demostrando que algunas especies absorben solutos en cantidades variables, especialmente cuando crecen en suelos diferentes.</p> <p>La fórmula de Murashige y Skoog (1962) se emplea para propósitos de este procedimiento, pues se ha demostrado que es el medio adecuado para una gran variedad de especies, así como para diferentes partes de una planta. Esta fórmula contiene grandes cantidades de macronutrientes; también contienen una alta concentración de nitrógeno en forma de <math>\text{NH}_4\text{NO}_3</math> y <math>\text{KNO}_3</math> (Hurtado, D. y Merino, E. 2000).</p>	
2.- Concentración y tipo de citocininas y auxinas en el medio de cultivo	<p>El crecimiento en las plantas es un proceso dinámico, complejo y que esta rigurosamente controlado, en el que los reguladores de crecimiento vegetal (auxinas, giberelinas y citocininas) juegan un papel principal en el control de crecimiento, no únicamente dentro de las plantas, sino también a nivel de órgano, tejido y célula (Wareing y Phillips, 1973).</p> <p>Las auxinas afectan alargamiento y división celular, formando los brotes, raíces y tejido calloso, influyen en la respiración, abscisión, partenocarpia, dominancia apical, embriogénesis, etcétera (Bidwell, 1979).</p>	



	<p>Haberlandt descubrió las citocininas, en sus trabajos de cultivo de embriones y tejidos in vitro, el demuestra que existía un factor difusible, el cual afecta a las células parenquimatosas. Casi todas las citocininas son derivados de la adenina, los cuales llevan el grupo amino en la posición 6, presentan actividad, citocinínica (Hurtado, D et al., 2000).</p> <p>A menudo, los medios óptimos para inducción y crecimiento de, callos a partir de explantes primarios no son los mismos que para establecimiento de suspensiones celulares; el nivel óptimo de auxinas y citocininas puede ser diferente (Torrey et al., 1961).</p>	
--	--	--

Variable dependiente:

Variable	Definición	Indicadores
3.- Eficiencia de la técnica de cultivo de tejidos vegetales para la introducción y establecimiento de la frambuesa en el sistema in vitro.	<p>Muir (1958), con la técnica nodriza y crecimiento en la microcamaras, aislo y describió las características de los clones celulares aislados.</p> <p>Murashige y Skoog (1962) desarrollaron un medio nutritivo con el que lograron un crecimiento rápido en tejidos de tabaco. En La actualidad, las sales inorgánicas de ese medio de cultivo se usan con bastante éxito en casi todas las especies.</p> <p>En el presente trabajo de investigación se pretende realizar un protocolo para establecer el medio de cultivo apropiado para establecimiento clonación de Frambuesa.</p>	<p>Número de plantas sobrevivientes.</p> <p>Número de Hojas</p> <p>Color de Hojas</p> <p>Aspecto de Hojas</p> <p>Número de Brotes</p> <p>Longitud de Tallo</p> <p>Color de Tallo</p> <p>Aspecto de Planta</p>

## ANEXO N° 02. Base de datos

BL OQ UE	Tie mp o	Concent racion M&S	Tipo y concentr acion	Sobre vivien tes	Númer o de Hojas	Color de Hojas	Aspect o de Hojas	Númer o de Brotos	Longitu d de Tallo	Color de Tallo	Aspect o de Planta
	Se ma na	%	ppm								
1	1	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
1	1	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
1	1	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	1	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	1	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	1	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
1	1	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	1	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	1	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	4	3	3
1	1	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
1	1	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	1	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	2	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	3	3	1	6	3	3

1	2	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
1	2	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	2	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	2	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	2	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
1	2	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	2	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	2	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	2	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
1	2	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	2	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	3	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
1	3	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
1	3	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	3	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	3	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3

1	3	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	3	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	3	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	3	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	3	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	3	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	3	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	4	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
1	4	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	4	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	4	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	4	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	4	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	4	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	4	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	4	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3

1	4	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	4	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	4	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	5	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	3	3	1	6	3	3
1	5	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	5	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	5	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	5	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	5	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	5	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	5	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	5	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	5	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	5	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	5	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	6	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3

1	6	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	6	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	6	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	6	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	6	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	6	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	6	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
1	6	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	6	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	6	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	6	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
1	7	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
1	7	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	7	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	7	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
1	7	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3

1	7	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
1	7	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
1	7	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
1	7	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	7	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
1	7	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
1	7	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	1	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
2	1	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
2	1	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	1	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
2	1	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	1	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	1	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	1	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	1	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3

2	1	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	1	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	1	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	2	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
2	2	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
2	2	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	2	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
2	2	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	2	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	2	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	2	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	2	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	2	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	2	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	2	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	3	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3



2	3	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
2	3	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	2	1	1	4	3	1
2	3	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	2	1	1	3	3	1
2	3	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	3	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	3	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	3	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	3	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	3	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	3	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	3	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	4	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
2	4	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
2	4	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	4	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	4	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3

2	4	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
2	4	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	4	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	4	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	4	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
2	4	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	4	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	5	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	3	3	1	7	3	3
2	5	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
2	5	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	5	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	5	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	5	3	3
2	5	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	6	2	3
2	5	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	5	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	5	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3

2	5	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
2	5	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	5	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	6	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
2	6	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
2	6	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	6	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	6	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	5	3	3
2	6	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	3	4	3	3
2	6	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	6	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	6	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	6	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	6	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	6	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	7	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3

2	7	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	7	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	7	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	7	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	7	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	3	4	3	3
2	7	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	7	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	7	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
2	7	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	7	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
2	7	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
3	1	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	3	3	1	7	3	3
3	1	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
3	1	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
3	1	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
3	1	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3

3	1	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	3	5	3	3
3	1	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	1	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	1	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	1	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	1	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	1	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	2	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
3	2	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
3	2	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	2	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
3	2	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	2	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	4	5	3	3
3	2	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	2	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
3	2	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3

3	2	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	2	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	2	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
3	3	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
3	3	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
3	3	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	3	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
3	3	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	5	3	3
3	3	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	4	5	3	3
3	3	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
3	3	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
3	3	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	3	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	3	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
3	3	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
3	4	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3

3	4	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
3	4	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	4	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
3	4	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	5	3	3
3	4	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	4	6	3	3
3	4	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	4	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
3	4	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	4	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
3	4	100	4 BAP+0.3 ANA	0	1	3	3	1	5	3	3
3	4	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
3	5	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
3	5	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
3	5	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	5	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
3	5	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3

3	5	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	4	6	3	3
3	5	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	5	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
3	5	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	5	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
3	5	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	5	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
3	6	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
3	6	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
3	6	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	3	3	1	5	3	3
3	6	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	3	3	1	4	3	3
3	6	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	6	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	3	6	3	3
3	6	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
3	6	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
3	6	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3



3	6	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
3	6	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
3	6	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
3	7	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
3	7	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
3	7	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
3	7	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
3	7	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	7	3	3
3	7	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
3	7	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
3	7	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
3	7	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
3	7	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
3	7	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
3	7	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
4	1	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	3	3	1	7	3	3

4	1	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
4	1	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
4	1	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
4	1	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	7	3	3
4	1	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
4	1	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	2	1	6	3	3
4	1	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
4	1	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	1	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
4	1	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
4	1	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
4	2	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	2	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
4	2	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
4	2	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
4	2	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	3	7	3	3

4	2	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	3	6	3	3
4	2	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
4	2	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	2	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	2	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
4	2	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
4	2	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	3	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	3	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
4	3	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
4	3	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
4	3	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	3	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	3	6	3	3
4	3	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
4	3	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
4	3	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3

4	3	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
4	3	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
4	3	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
4	4	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	3	3	1	7	3	3
4	4	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
4	4	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
4	4	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
4	4	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	7	3	3
4	4	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	3	7	3	3
4	4	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	4	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	4	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	4	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	4	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	4	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	5	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	2	1	7	3	3

4	5	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
4	5	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
4	5	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
4	5	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	5	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	4	7	3	3
4	5	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	5	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
4	5	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	5	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	5	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	5	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
4	6	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	2	1	7	3	3
4	6	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
4	6	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
4	6	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
4	6	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	7	3	3

4	6	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	4	7	3	3
4	6	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
4	6	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
4	6	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	6	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	6	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
4	6	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
4	7	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	7	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
4	7	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
4	7	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
4	7	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	7	3	3
4	7	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	4	8	3	3
4	7	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
4	7	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
4	7	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3

4	7	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
4	7	100	4 BAP+0.3 ANA	0	1	3	2	1	5	2	2
4	7	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	1	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
5	1	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
5	1	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
5	1	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
5	1	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	7	3	3
5	1	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	4	8	3	3
5	1	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
5	1	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	1	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
5	1	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	1	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
5	1	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	2	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3

5	2	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
5	2	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	3	3	1	5	3	3
5	2	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	3	3	1	4	3	3
5	2	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	7	3	3
5	2	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	3	8	3	3
5	2	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	2	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	2	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
5	2	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	2	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	2	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	3	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	2
5	3	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
5	3	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
5	3	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	2	1	4	3	3
5	3	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	8	3	3



5	3	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
5	3	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	3	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	3	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	3	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
5	3	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	3	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
5	4	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	2	3	1	7	3	2
5	4	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
5	4	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
5	4	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	2	1	4	3	3
5	4	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	8	3	3
5	4	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	2	1	3	3
5	4	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	4	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	4	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3

5	4	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
5	4	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	4	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
5	5	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
5	5	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	6	3	3
5	5	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
5	5	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	2	1	4	3	3
5	5	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	3	8	3	3
5	5	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	3	1	3	3
5	5	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	5	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
5	5	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	5	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	5	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	5	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
5	6	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3

5	6	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
5	6	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
5	6	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	2	1	4	3	3
5	6	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	6	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	3	7	3	3
5	6	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
5	6	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	6	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	6	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	6	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	6	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
5	7	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	2	3	1	7	3	2
5	7	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
5	7	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
5	7	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	2	1	4	3	3
5	7	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	8	3	2

5	7	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	3	7	3	3
5	7	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
5	7	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
5	7	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
5	7	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
5	7	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
5	7	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
6	1	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	2	2	1	7	3	2
6	1	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
6	1	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
6	1	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	2	1	4	3	3
6	1	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
6	1	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	4	8	3	3
6	1	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
6	1	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
6	1	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3

6	1	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
6	1	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
6	1	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
6	2	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	2	1	7	3	2
6	2	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
6	2	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
6	2	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	2	1	4	3	3
6	2	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
6	2	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	4	8	3	3
6	2	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	1	3	2
6	2	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
6	2	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
6	2	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
6	2	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
6	2	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	2	3	3
6	3	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3

6	3	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
6	3	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	2
6	3	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	2	1	4	3	2
6	3	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	3	8	3	3
6	3	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	4	8	3	3
6	3	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	2	1	1	2	2
6	3	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
6	3	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
6	3	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
6	3	100	4 BAP+0.3 ANA	0	1	3	2	1	5	3	3
6	3	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
6	4	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
6	4	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
6	4	0	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	5	3	3
6	4	0	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	2	1	4	3	3
6	4	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	8	3	3

6	4	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	4	1	3	3
6	4	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
6	4	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
6	4	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3
6	4	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
6	4	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
6	4	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
6	5	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	7	3	3
6	5	0	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	4	3	3
6	5	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	3	3	1	5	3	3
6	5	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	3	2	1	4	3	3
6	5	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	3	8	3	3
6	5	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	3	1	3	3
6	5	50	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
6	5	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
6	5	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	8	3	3

6	5	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
6	5	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
6	5	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	1	3	3
6	6	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	0	1	2	2	1	7	2	2
6	6	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	2	2	1	6	2	2
6	6	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	2	2	1	5	2	2
6	6	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	3	3	1	4	2	2
6	6	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	25	3	3
6	6	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	2	25	3	3
6	6	50	4 BAP+0.3 ANA	0	1	3	3	1	1	3	2
6	6	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	28	3	3
6	6	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	3	3	1	25	3	3
6	6	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
6	6	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	2	3	3
6	6	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
6	7	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	0	2	2	2	1	7	2	2



6	7	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	2	2	1	6	2	2
6	7	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	3	3	1	4	2	2
6	7	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	2	2	1	4	2	2
6	7	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	25	3	3
6	7	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
6	7	50	4 BAP+0.3 ANA	0	1	3	3	1	1	3	2
6	7	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	28	3	3
6	7	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	3	3	1	25	3	3
6	7	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
6	7	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	2	3	3
6	7	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	27	3	3
7	1	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	0	1	2	2	1	7	2	2
7	1	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	3	3	1	6	2	2
7	1	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	3	3	1	5	2	2
7	1	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	3	2	1	4	2	2
7	1	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	3	25	3	3

7	1	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	3	22	3	3
7	1	50	4 BAP+0.3 ANA	0	1	3	3	1	1	3	2
7	1	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
7	1	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	3	3	1	25	3	3
7	1	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
7	1	100	4 BAP+0.3 ANA	1	3	3	3	1	2	3	3
7	1	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
7	2	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	0	1	3	2	1	7	2	2
7	2	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	3	3	1	4	2	2
7	2	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	3	3	1	5	2	2
7	2	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	3	3	1	4	2	2
7	2	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
7	2	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	3	22	3	3
7	2	50	4 BAP+0.3 ANA	0	1	3	3	1	1	3	2
7	2	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	28	3	3
7	2	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	3	3	1	25	3	3

7	2	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
7	2	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	2	3	3
7	2	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	27	3	3
7	3	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	2	2	1	7	2	2
7	3	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	3	3	1	4	2	2
7	3	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	2	2	1	4	2	2
7	3	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	2	2	1	4	2	2
7	3	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	25	3	3
7	3	50	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	3	3	3	23	3	3
7	3	50	4 BAP+0.3 ANA	0	1	3	3	1	1	3	2
7	3	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
7	3	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	3	3	1	25	3	3
7	3	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
7	3	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
7	3	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
7	4	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	2	2	1	7	2	2

7	4	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	3	3	1	4	2	2
7	4	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	2	2	1	5	2	2
7	4	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	2	2	1	4	2	2
7	4	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
7	4	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	4	23	3	3
7	4	50	4 BAP+0.3 ANA	0	1	3	3	1	1	3	2
7	4	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
7	4	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	3	3	1	25	3	3
7	4	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
7	4	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
7	4	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
7	5	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	2	2	1	7	2	2
7	5	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	3	3	1	4	2	2
7	5	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	2	2	1	5	2	2
7	5	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	3	3	1	4	2	2
7	5	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3

7	5	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	4	23	3	3
7	5	50	4 BAP+0.3 ANA	0	1	3	3	1	1	3	2
7	5	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
7	5	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	3	3	1	25	3	3
7	5	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
7	5	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
7	5	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
7	6	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	0	1	2	2	1	7	2	2
7	6	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	2	2	1	4	2	2
7	6	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	3	2	1	5	2	2
7	6	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	2	2	1	4	2	2
7	6	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	3	25	3	3
7	6	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	4	25	3	3
7	6	50	4 BAP+0.3 ANA	0	1	3	2	1	1	3	2
7	6	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
7	6	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	3	3	1	25	3	3

7	6	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
7	6	100	4 BAP+0.3 ANA	0	1	3	2	1	1	3	2
7	6	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
7	7	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	0	1	2	2	1	7	2	2
7	7	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	2	2	1	4	1	2
7	7	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	2	3	1	5	2	2
7	7	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	2	2	1	4	2	2
7	7	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	25	3	3
7	7	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	4	25	3	3
7	7	50	4 BAP+0.3 ANA	0	1	3	3	1	1	3	2
7	7	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
7	7	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	3	3	1	25	3	3
7	7	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
7	7	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
7	7	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
8	1	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	0	1	2	2	1	7	2	2

8	1	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	2	2	1	4	2	2
8	1	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	2	2	1	5	2	1
8	1	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	2	2	1	4	2	1
8	1	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	3	25	3	3
8	1	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	3	25	3	3
8	1	50	4 BAP+0.3 ANA	0	1	3	3	1	1	3	2
8	1	50	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
8	1	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	3	3	1	25	3	3
8	1	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
8	1	100	4 BAP+0.3 ANA	1	1	3	3	1	25	3	3
8	1	100	8 BAP+0.6 ANA	1	1	3	3	1	3	3	3
8	2	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	0	1	2	2	1	7	2	2
8	2	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	2	2	1	7	2	2
8	2	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	2	2	1	5	2	2
8	2	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	2	2	1	5	2	2
8	2	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	4	1	2

8	2	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	8	3	3	5	4	1	2
8	2	50	4 BAP+0.3 ANA	0	3	3	2	4	1	1	2
8	2	50	8 BAP+0.6 ANA	0	2	3	3	6	45	1	3
8	2	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	7	3	3	4	25	1	3
8	2	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	7	3	3	4	3	1	3
8	2	100	4 BAP+0.3 ANA	1	6	3	3	4	3	1	3
8	2	100	8 BAP+0.6 ANA	1	6	3	3	5	35	1	2
8	3	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	0	2	2	1	2	1	1	1
8	3	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	2	2	1	7	2	2
8	3	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	2	1	1	5	2	2
8	3	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	2	2	1	5	1	2
8	3	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	4	1	2
8	3	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	6	3	3	6	4	2	3
8	3	50	4 BAP+0.3 ANA	0	3	3	2	4	1	1	2
8	3	50	8 BAP+0.6 ANA	0	3	3	3	6	45	1	3
8	3	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	7	3	3	4	25	1	3



8	3	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	7	3	3	4	3	1	3
8	3	100	4 BAP+0.3 ANA	1	6	3	3	4	3	1	3
8	3	100	8 BAP+0.6 ANA	1	5	3	3	5	35	1	3
8	4	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	0	1	2	2	1	7	2	2
8	4	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	2	2	1	7	2	2
8	4	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	2	1	1	5	2	2
8	4	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	2	1	1	5	2	2
8	4	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	3	3	2	4	1	2
8	4	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	6	3	3	6	38	1	3
8	4	50	4 BAP+0.3 ANA	0	4	3	2	5	1	2	2
8	4	50	8 BAP+0.6 ANA	1	6	3	3	5	5	1	3
8	4	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	7	3	3	4	25	1	3
8	4	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	6	3	3	4	3	1	3
8	4	100	4 BAP+0.3 ANA	1	6	3	3	3	3	1	3
8	4	100	8 BAP+0.6 ANA	1	6	3	3	5	35	1	2
8	5	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	0	1	2	2	1	7	2	2

8	5	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	2	2	1	5	2	2
8	5	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	2	1	1	5	2	2
8	5	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	2	1	1	5	1	2
8	5	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	5	3	3	2	4	1	3
8	5	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	6	3	3	6	38	1	3
8	5	50	4 BAP+0.3 ANA	0	2	3	2	5	1	2	2
8	5	50	8 BAP+0.6 ANA	0	6	3	3	4	45	1	3
8	5	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	7	3	3	4	25	1	2
8	5	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	6	3	3	4	3	1	3
8	5	100	4 BAP+0.3 ANA	1	6	3	3	4	3	1	3
8	5	100	8 BAP+0.6 ANA	1	5	3	3	5	35	1	2
8	6	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	2	1	2	1	1	2
8	6	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	2	2	1	5	2	2
8	6	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	2	1	1	5	2	2
8	6	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	2	2	1	5	2	2
8	6	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	5	3	2	2	4	1	3

8	6	50	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	3	3	4	25	1	3
8	6	50	4 BAP+0.3 ANA	0	3	3	2	5	1	2	2
8	6	50	8 BAP+0.6 ANA	0	6	3	3	4	45	1	3
8	6	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	7	3	3	4	25	1	2
8	6	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	6	3	3	4	3	1	3
8	6	100	4 BAP+0.3 ANA	1	6	3	3	4	25	1	3
8	6	100	8 BAP+0.6 ANA	1	6	3	3	5	3	1	3
8	7	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	2	1	1	1	1	2
8	7	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	2	1	1	5	2	2
8	7	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	2	1	1	6	2	2
8	7	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	2	2	1	5	1	2
8	7	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	5	3	2	2	4	1	2
8	7	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	6	3	3	5	38	1	3
8	7	50	4 BAP+0.3 ANA	0	2	3	2	5	1	1	2
8	7	50	8 BAP+0.6 ANA	1	7	3	3	5	5	1	3
8	7	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	7	3	3	4	25	1	2

8	7	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	6	3	3	4	3	1	3
8	7	100	4 BAP+0.3 ANA	1	6	3	3	4	3	1	3
8	7	100	8 BAP+0.6 ANA	1	7	3	3	5	3	1	3
9	1	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	2	1	1	1	1	1
9	1	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	2	1	1	5	2	2
9	1	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	2	2	1	6	2	2
9	1	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	2	1	1	5	2	2
9	1	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	6	3	2	2	4	1	2
9	1	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	6	3	3	5	38	1	3
9	1	50	4 BAP+0.3 ANA	0	3	3	2	5	1	1	2
9	1	50	8 BAP+0.6 ANA	0	7	3	3	4	45	1	3
9	1	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	7	3	3	4	25	1	3
9	1	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	6	3	3	4	3	1	3
9	1	100	4 BAP+0.3 ANA	1	6	3	3	4	25	1	3
9	1	100	8 BAP+0.6 ANA	1	7	3	3	5	3	1	3
9	2	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	0	1	2	2	1	7	2	2

9	2	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	2	1	1	5	2	1
9	2	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	2	2	1	96	2	2
9	2	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	2	1	1	5	2	2
9	2	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	3	3	3	2	4	1	3
9	2	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	5	3	3	5	4	1	3
9	2	50	4 BAP+0.3 ANA	0	2	3	2	5	1	2	2
9	2	50	8 BAP+0.6 ANA	0	6	3	3	4	45	1	3
9	2	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	7	3	3	4	25	1	3
9	2	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	6	3	3	4	3	1	3
9	2	100	4 BAP+0.3 ANA	0	6	3	3	1	1	1	2
9	2	100	8 BAP+0.6 ANA	1	6	3	3	5	3	1	3
9	3	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	0	1	2	2	1	7	1	2
9	3	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	2	2	1	5	1	1
9	3	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	2	1	1	6	2	2
9	3	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	2	2	1	5	2	2
9	3	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	3	3	2	4	1	3

9	3	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	6	3	3	5	4	1	3
9	3	50	4 BAP+0.3 ANA	0	3	3	2	5	1	2	2
9	3	50	8 BAP+0.6 ANA	1	7	3	3	4	5	1	3
9	3	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	8	3	3	4	25	1	3
9	3	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	6	3	3	4	3	1	3
9	3	100	4 BAP+0.3 ANA	1	5	3	3	4	25	1	3
9	3	100	8 BAP+0.6 ANA	1	7	3	3	5	3	1	3
9	4	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	0	1	2	2	1	7	2	2
9	4	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	2	2	1	5	2	2
9	4	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	2	1	1	6	2	2
9	4	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	2	1	1	5	2	2
9	4	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	3	3	2	4	1	3
9	4	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	6	3	3	5	4	1	3
9	4	50	4 BAP+0.3 ANA	0	5	3	2	5	1	2	2
9	4	50	8 BAP+0.6 ANA	1	7	3	3	4	5	1	3
9	4	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	8	3	3	4	25	1	3

9	4	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	6	3	3	4	3	1	3
9	4	100	4 BAP+0.3 ANA	1	6	3	3	4	25	1	3
9	4	100	8 BAP+0.6 ANA	1	6	3	3	5	3	1	3
9	5	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	0	1	2	1	1	7	1	1
9	5	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	2	1	1	7	1	1
9	5	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	2	1	1	6	2	1
9	5	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	2	1	1	5	1	1
9	5	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	2	2	3	6	1	1
9	5	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	11	3	3	6	6	1	3
9	5	50	4 BAP+0.3 ANA	0	6	3	2	4	28	1	3
9	5	50	8 BAP+0.6 ANA	0	12	3	3	2	65	1	3
9	5	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	14	3	3	6	3	2	3
9	5	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	14	3	3	7	4	1	3
9	5	100	4 BAP+0.3 ANA	1	12	3	3	5	3	1	3
9	5	100	8 BAP+0.6 ANA	1	11	3	3	7	35	1	3
9	6	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	0	2	1	1	1	1	1	1

9	6	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	1	1	1	7	1	1
9	6	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	1	1	1	5	1	1
9	6	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	2	1	1	5	1	1
9	6	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	2	3	2	6	1	1
9	6	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	12	2	3	6	6	1	3
9	6	50	4 BAP+0.3 ANA	0	6	3	2	4	28	1	3
9	6	50	8 BAP+0.6 ANA	0	12	3	3	2	65	1	3
9	6	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	14	3	3	6	3	2	3
9	6	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	14	3	3	5	4	1	3
9	6	100	4 BAP+0.3 ANA	1	12	3	3	5	3	1	3
9	6	100	8 BAP+0.6 ANA	1	11	3	3	5	35	1	3
9	7	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	0	1	1	1	1	7	1	1
9	7	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	1	1	1	5	1	1
9	7	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	1	1	1	6	1	1
9	7	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	2	1	1	5	1	1
9	7	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	2	2	3	6	1	1



9	7	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	12	3	3	6	58	1	3
9	7	50	4 BAP+0.3 ANA	0	5	3	2	4	28	1	3
9	7	50	8 BAP+0.6 ANA	1	13	3	3	5	65	1	3
9	7	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	14	2	3	6	3	2	3
9	7	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	12	3	3	4	4	1	3
9	7	100	4 BAP+0.3 ANA	1	12	3	3	5	4	1	3
9	7	100	8 BAP+0.6 ANA	1	13	3	3	5	4	1	3
10	1	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	0	1	1	1	1	7	1	1
10	1	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	2	1	1	5	1	1
10	1	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	1	1	1	6	1	1
10	1	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	3	1	1	5	1	1
10	1	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	11	3	3	5	6	1	1
10	1	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	12	3	3	6	58	1	3
10	1	50	4 BAP+0.3 ANA	0	5	3	2	3	28	1	3
10	1	50	8 BAP+0.6 ANA	0	12	3	3	2	65	1	3
10	1	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	14	2	3	5	3	2	3

10	1	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	12	3	3	7	4	1	3
10	1	100	4 BAP+0.3 ANA	1	12	3	3	5	4	1	3
10	1	100	8 BAP+0.6 ANA	1	11	3	3	6	35	1	3
10	2	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	2	1	1	1	1	1	1
10	2	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	1	1	1	5	1	1
10	2	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	1	1	1	5	1	1
10	2	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	3	1	1	5	1	1
10	2	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	11	3	3	5	6	1	1
10	2	50	2 BAP+0.1 5 ANA	0	4	3	3	3	25	1	3
10	2	50	4 BAP+0.3 ANA	0	5	3	2	3	3	1	3
10	2	50	8 BAP+0.6 ANA	0	13	3	3	3	65	1	3
10	2	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	14	3	3	6	3	2	3
10	2	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	12	3	3	7	4	1	3
10	2	100	4 BAP+0.3 ANA	1	12	3	3	5	3	1	3
10	2	100	8 BAP+0.6 ANA	1	12	2	3	5	3	1	3
10	3	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	1	1	1	7	1	1

10	3	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	1	1	1	5	2	1
10	3	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	1	1	1	6	1	1
10	3	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	3	1	1	5	1	1
10	3	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	11	3	2	5	6	1	1
10	3	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	12	3	3	6	58	1	3
10	3	50	4 BAP+0.3 ANA	0	5	3	2	3	3	1	3
10	3	50	8 BAP+0.6 ANA	1	13	3	3	3	65	1	3
10	3	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	12	3	3	5	3	2	3
10	3	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	12	3	3	7	4	1	3
10	3	100	4 BAP+0.3 ANA	1	12	3	3	5	3	1	3
10	3	100	8 BAP+0.6 ANA	1	14	3	3	4	4	1	3
10	4	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	1	2	1	1	7	1	1
10	4	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	1	1	1	5	1	1
10	4	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	1	1	1	6	1	1
10	4	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	3	1	1	5	1	1
10	4	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	12	3	3	6	6	1	3

10	4	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	11	3	3	6	58	1	3
10	4	50	4 BAP+0.3 ANA	0	5	3	2	3	3	1	3
10	4	50	8 BAP+0.6 ANA	0	13	3	3	3	65	1	3
10	4	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	14	3	3	6	3	2	3
10	4	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	12	3	3	7	4	1	3
10	4	100	4 BAP+0.3 ANA	1	12	3	3	1	25	1	3
10	4	100	8 BAP+0.6 ANA	1	12	3	3	5	3	1	3
10	5	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	0	1	1	1	1	7	1	1
10	5	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	1	1	1	5	1	1
10	5	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	1	1	1	6	1	2
10	5	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	3	1	1	5	1	1
10	5	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	8	3	3	3	6	1	3
10	5	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	10	3	3	6	6	1	3
10	5	50	4 BAP+0.3 ANA	0	5	3	2	3	3	1	3
10	5	50	8 BAP+0.6 ANA	0	12	3	3	3	65	1	3
10	5	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	12	3	3	5	3	2	3

10	5	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	12	3	3	7	4	1	3
10	5	100	4 BAP+0.3 ANA	0	12	3	3	5	1	1	3
10	5	100	8 BAP+0.6 ANA	1	14	2	3	5	3	1	3
10	6	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	0	1	1	1	1	7	1	1
10	6	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	2	1	1	5	1	1
10	6	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	1	1	1	6	1	1
10	6	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	3	1	1	5	1	1
10	6	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	6	3	3	2	6	1	3
10	6	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	11	3	3	5	6	1	3
10	6	50	4 BAP+0.3 ANA	0	5	3	2	2	3	1	3
10	6	50	8 BAP+0.6 ANA	1	13	3	3	4	65	1	3
10	6	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	14	3	3	5	3	2	3
10	6	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	12	3	3	6	4	1	3
10	6	100	4 BAP+0.3 ANA	1	12	3	3	6	4	1	3
10	6	100	8 BAP+0.6 ANA	1	12	3	3	4	4	1	3
10	7	0	0.0 BAP+ 0.00 ANA	0	1	1	1	1	7	1	1

10	7	0	2 BAP+0.1 5 ANA	0	1	2	1	1	5	1	1
10	7	0	4 BAP+0.3 ANA	0	1	1	1	1	6	1	1
10	7	0	8 BAP+0.6 ANA	0	1	3	1	1	5	1	1
10	7	50	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	6	3	3	3	6	1	2
10	7	50	2 BAP+0.1 5 ANA	1	12	3	3	6	6	1	3
10	7	50	4 BAP+0.3 ANA	0	5	3	2	1	3	1	3
10	7	50	8 BAP+0.6 ANA	1	13	3	3	4	65	1	3
10	7	100	0.0 BAP+ 0.00 ANA	1	14	3	3	4	3	2	3
10	7	100	2 BAP+0.1 5 ANA	1	12	3	3	5	4	1	3
10	7	100	4 BAP+0.3 ANA	1	12	3	3	5	4	1	3
10	7	100	8 BAP+0.6 ANA	1	14	3	3	3	4	1	3

### ANEXO N° 03. Matriz de consistencia

**TÍTULO: EFICIENCIA DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES COMO HERRAMIENTA PARA LA INTRODUCCIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE LA FRAMBUESA (*Rubus Idaeus* L.) EN EL SISTEMA IN VITRO**

PROBLEMAS	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES		Metodología
<b>Problema general</b>  ¿Cuál es la eficiencia del cultivo de tejidos vegetales como herramienta para la introducción y establecimiento de la frambuesa ( <i>Rubus Idaeus</i> L.) en el sistema in vitro?	<b>Objetivo general</b>  Determinar la eficiencia del cultivo de tejidos vegetales como herramienta para la introducción y establecimiento de la frambuesa ( <i>Rubus Idaeus</i> L.) en el sistema in vitro.	<b>Hipótesis general</b>  Existe eficiencia del cultivo de tejidos vegetales como herramienta para la introducción y establecimiento de la frambuesa ( <i>Rubus Idaeus</i> L.) en el sistema in vitro.	<b>Variable 1</b>  Concentración de macro y micronutrientes en el medio de cultivo (X1)	<b>Dimensiones</b>  0% M&S 50% M&S 100% M&S	<b>Enfoque:</b> Cuantitativo  <b>Diseño:</b> Experimental  <b>Nivel:</b> Experimento Puro  <b>Población</b>
<b>Problemas específicos</b>	<b>Objetivos específicos</b>				

<p>(a) ¿ Cuáles son las diferencias significativas en la tasa de regeneración de los explantes de frambuesa bajo diferentes condiciones de tipo y concentración de cultivo in vitro?</p> <p>(b) ¿ Cuáles son las diferencias significativas en la tasa de regeneración de los explantes de frambuesa bajo diferentes condiciones de concentración de</p>	<p>(a) identificar las diferencias significativas en la tasa de regeneración de los explantes de frambuesa bajo diferentes condiciones de tipo y concentración de cultivo in vitro .</p> <p>(b) Evaluar las diferencias significativas en la tasa de regeneración de los explantes de frambuesa bajo diferentes condiciones de concentración de M&amp;S de cultivo in vitro.</p> <p>(c) Evaluar la relación entre las concentraciones de hormonas de</p>	<p><b>Hipótesis específicas</b></p> <p>(a) Existe diferencias significativas en la tasa de regeneración de los explantes de frambuesa bajo diferentes condiciones de tipo y concentración de cultivo in vitro .</p> <p>(b) Existe diferencias significativas en la tasa de regeneración de los explantes de</p>	<p>Concentración y tipo de citocininas y auxinas en el medio de cultivo (X2)</p> <p><b>Variable 2</b></p> <p>Eficiencia de la técnica de cultivo de tejidos vegetales para la introducción</p>	<p>8 ppm BAP+0,6 ppm ANA 0,0 ppm BAP+0,00 ppm ANA 2 ppm BAP+0,15 ppm ANA 4 ppm BAP+0,3 ppm ANA</p> <p>Número de plantas sobrevivientes. Número de Hojas Color de Hojas Aspecto de Hojas Número de Brotes</p>	<p>840</p> <p><b>Muestra</b></p> <p>840</p> <p><b>Instrumentos de recolección de datos</b></p> <p><b>Técnicas:</b> Observación</p> <p><b>Instrumentos:</b> Ficha de observación</p>
--	--	---	--	--	---



M&S de cultivo in vitro? (c) ¿Cuál es la relación entre las concentraciones de hormonas de crecimiento y la proliferación de tejidos de frambuesa?	crecimiento y la proliferación de tejidos de frambuesa.	frambuesa bajo diferentes condiciones de concentración de M&S de cultivo in vitro. (c) Existe relación la relación entre las concentraciones de hormonas de crecimiento y la proliferación de tejidos de frambuesa.	y establecimiento de la frambuesa en el sistema in vitro. (Y)	Longitud de Tallo Color de Tallo Aspecto de Planta	
--	---	--	---	--	--