



**UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS RECURSOS**  
**NATURALES Y DEL AMBIENTE**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**PERFIL DE PROYECTO**

**TEMA:**

**EVALUACIÓN DE PLANTULAS DE MORA DE CASTILLA ( *Rubus glaucus beth* ) PROPAGADAS MEDIANTE MULTIPLICACIÓN IN VITRO UTILIZANDO DOS TIPOS DE CITOQUININAS EN TRES DOSIS**

Tesis de grado previo a la obtención del título de ingeniero Agrónomo, otorgado por la Universidad estatal de Bolívar a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Escuela de Ingeniería Agronómica.

**DIRECTOR:**

**ING. CÉSAR BARBERAN Mg.**

**AUTOR:**

**TARJELIA NATIVIDAD CUESTAS VELÓZ**

**GUARANDA – ECUADOR**

**2018**

**EVALUACIÓN DE PLANTULAS DE MORA DE CASTILLA ( *Rubus*  
*glaucus beth* ) PROPAGADAS MEDIANTE MULTIPLICACIÓN IN VITRO  
UTILIZANDO DOS TIPOS DE CITOQUININAS EN TRES DOSIS**

**REVISADO Y APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DEL  
PROYECTO:**

-----  
ING. CESAR BARBERAN Mg.  
**DIRECTOR DE TESIS**

-----  
ING. KLEBER ESPINOZA MORA Mg  
**BIOMETRISTA.**

-----  
DR. FERNANDO VELOZ  
**AREA REDACCION TECNICA**

## **CERTIFICACION DE AUTORIA**

Yo, Tárjela Natividad Cuestas Veloz, con CI 020236490-7, declaro que el trabajo y los resultados presentados en este informe, no han sido previamente reportados para ningún grado o calificación profesional; y, que las referencias bibliográficas que se incluyen han sido consultadas y citadas con su respectivo autor(es). La Universidad Estatal de Bolívar, puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo de investigación, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, su Reglamentación y la Normativa Institucional vigente.

-----  
**Tárjela Cuestas Veloz**  
**CI. 020236490-7**

-----  
**Ing. Cesar Barberan Mg.**  
**CI.**

-----  
**Ing. Kleber Espinoza Mg**  
**CI.020098963 - 0**

## **DEDICATORIA**

Este trabajo de investigación es dedicado con amor y confianza a Dios por fortalecerme en cada una de las adversidades en este proceso de investigación, por darme la oportunidad de alcanzar esta meta profesional, a mis padres y familia por su amor eterno y confianza, a mi esposo por su apoyo confianza y paciencia en el proceso de esta investigación, a mi bebe por ser mi inspiración y mis ganas de seguir sin cesar en cada obstáculo que se presenta en esta vida, a mis amigos y conocidos que de corazón me inspiran a continuar en este proceso a diario.

*Natividad Cuesta Veloz.*

## **AGRADECIMIENTO**

Mi agradecimiento y amor a Dios por sus grandes bendiciones, en cada proceso transcurrido en esta investigación.

A mi familia por su apoyo, constancia y paciencia en todo momento.

A la Universidad Estatal de Bolívar Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos naturales y del Ambiente por ser el templo del saber en mi proceso de formación educativa.

Agradezco a quienes fueron parte de este proyecto de investigación ya que gracias a sus conocimientos esto pudo llegar a su feliz término.

Mi agradecimiento y gratificación al Ing. Cesar Barberan Director del proyecto por brindarnos su amistad, conocimientos y confianza en esta investigación.

Al docente y amigo Ing. Klever Espinoza Mora Mg. Biometrista por sus conocimientos aplicados, paciencia y respaldo en esta investigación.

Al Dr. Fernando Veloz por su infinito apoyo y animo en el transcurso de este proyecto y proceso estudiantil.

Al Ing. Víctor Hugo Cortez quien estuvo presente en cada uno de los procesos realizados en el laboratorio quien no solo me brindo su conocimiento sino también su amistad, dándome animo en cada una de las etapas de esta investigación.

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>Contenido</b>	<b>PAG</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. PROBLEMA.....</b>	<b>3</b>
<b>III. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>5</b>
3.1. Origen.....	5
3.2. Clasificación botánica .....	5
3.3. Clasificación taxonómica .....	6
3.4. Morfología.....	6
3.4.1. Tallo.....	6
3.4.2. Hojas.....	7
3.4.3. Flores .....	7
3.4.4. Fruto .....	7
3.4.5. Raíz.....	7
3.5. Propagación .....	8
3.5.1. Por estacas.....	8
3.5.2. Acodo de punta o terminal .....	8
3.5.3. Acodo rastrero y terminal .....	8
3.5.4. Propagación por raíz o fragmentos de tallo subterráneo.....	8
3.6. Cultivo de tejidos in vitro .....	9
3.6.1. Generalidades .....	9
3.6.2. Cultivo de tejidos.....	9
3.6.3. Cultivo de meristemas y yemas axilares .....	10
3.6.5. Componentes inorgánicos del medio de cultivo .....	11
3.6.6. Componentes orgánicos del medio de cultivo .....	15
3.6.6.1. Carbohidratos.....	15
3.6.6.2. Vitaminas .....	15
3.6.6.3. Aminoácidos y extractos naturales .....	16
3.6.6.4. Agentes gelificantes .....	16
3.6.6.5. Agua.....	16
3.7. Reguladores del crecimiento vegetal.....	17
3.7.1. Auxinas.....	18
3.7.2. Citocininas .....	19
3.7.3. Giberelinas .....	20
3.7.4. Ácido Abscísico .....	21
3.7.5. Etileno .....	21
3.8. Medios de cultivo.....	22
3.8.1. Carbohidratos o azúcares .....	22

3.8.2.	Vitaminas y aminoácidos .....	22
3.9.	Cultivo in vitro.....	23
3.9.1.	Generalidades .....	23
3.9.2.	Aplicaciones prácticas del cultivo in vitro .....	23
3.10.	Etapas de la propagación in vitro .....	24
3.10.1.	Etapa I.....	24
3.10.2.	Selección del ex plante.....	24
3.10.3.	Genotipo .....	24
3.10.4.	Edad de la planta.....	25
3.10.5.	Edad del órgano o tejido.....	25
3.10.6.	Estado fisiológico .....	25
3.10.7.	Estado sanitario .....	25
3.10.9.	Tamaño del ex plante .....	26
3.10.10.	Protocolo de desinfección.....	26
3.11.	Etapa II .....	26
3.12.	Etapa III.....	26
3.13.	Etapa IV .....	27
3.14.	Factores limitantes .....	27
3.14.1.	Fenolización .....	27
3.14.2.	Contaminación.....	28
3.15.	Requerimientos para un laboratorio .....	28
3.15.1.	Área de preparación.....	28
3.15.2.	Área de transferencia.....	28
3.15.3.	Área de incubación.....	29
3.15.4.	Área de crecimiento .....	29
3.15.5.	Área de cuarentena y de control fitosanitario.....	29
IV.	MARCO METODOLÓGICO.....	30
4.1.	Materiales.....	30
4.1.1.	Localización de la investigación .....	30
4.1.2.	Situación climática y geográfica.....	30
4.1.3.	Zona de vida.....	30
4.1.4.	Material experimental.....	30
4.1.5.	Equipos del laboratorio .....	30
4.1.6.	Materiales de campo .....	31
4.1.7.	Materiales del laboratorio .....	31
4.1.8.	Materiales de oficina .....	32
4.2.1.	Tratamientos.....	33
4.3.	Tipo de diseño experimental.....	33
4.3.1.	Procedimiento .....	33
4.3.2.	Tipos de análisis.....	33
4.4.	Métodos de evaluación y datos tomados.....	34

4.4.1.	Número de explantes contaminados (NEC) .....	34
4.4.2.	Días a transferir a un medio de multiplicación (DTMM) .....	34
4.4.3.	Número de brotes por explante (NBE) .....	34
4.4.4.	Longitud de los brotes (LB) .....	34
4.4.5.	Número de hojas por brote (NHB).....	34
4.4.6.	Días a la emisión de raíces (DER) .....	34
4.4.7.	Longitud de la raíz (LR) .....	35
4.4.8.	Volumen de la raíz (VR) .....	35
4.5.	<b>MANEJO DEL EXPERIMENTO</b> .....	35
4.5.1.	Selección de la planta .....	35
4.5.2.	Recolección de brotes en el campo .....	35
4.5.3.	Evitar deshidratación del material vegetativo .....	35
4.5.4.	Desinfección del material en el laboratorio.....	36
4.5.5.	Selección del medio a utilizar .....	36
4.5.6.	Introducción del material <i>in vitro</i> .....	38
V.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	39
5.3.	<b>ANÁLISIS DE CORRELACION Y REGRESION LINEAL</b> .....	65
5.4.	<b>COEFICIENTE DE CORRELACION (r)</b> .....	65
5.5.	<b>COEFICIENTE DE REGRESION (b)</b> .....	65
5.6.	<b>COEFICIENTE DE DETERMINACION (R<sup>2</sup> %)</b> .....	66
VI.	<b>COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS</b> .....	67
VII.	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	68
7.1.	Conclusiones .....	68
7.2.	Recomendaciones .....	69
VIII.	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	70

## INDICE DE CUADROS

### DENOMINACION

N°	PAG
1. Resultado del análisis del efecto principal para evaluar promedios del Factor A: variables. Numero de Explantes contaminados (NEC) evaluado a los 90 días y Días a la trasferencia de medios de multiplicación (DTMM) a los 30 días.....	31
2. Resultados de la prueba de Tukey al 5% para comparar promedios de tratamiento Factor B de las variables Número de explantes contaminados (NEC) y Días a la transferencia a medios de multiplicación.....	41
3. Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de tratamiento (AXB) en las variables número de explantes contaminados y días a la transferencia de medios de multiplicación.....	42
4. Análisis de efecto para comparar promedios de Factor A dosis en las variables Número de brotes por explante (NBE) a los 60 y 90 días, longitud del brote (LB), a los 30, 60 y 90 días y la variable Numero de hojas del brote (NHB), a los 30, 60 y 90 días.....	45
5. Resultado de la prueba de Tukey al 5% para evaluar promedios del Factor B: En las variables Número de Brotes por Explantes (NEE), Longitud del Brote (LB) Número de hojas del brote (NHB), a los 30, 60 y 90 días.....	49
6. Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de tratamiento (AXB) en las variables Número de brotes por explante (NBE), Longitud del brote (LB), Número de hojas del brote (NHB), a los 90 días.....	52
7. Resultado del análisis del efecto principal para evaluar promedios del Factor A: Citoquininas A1: Bencyl adenina, A2: Kinetina. En las variables Días a la	

emisión de raíces (DER) a los 30 días, Longitud de la raíz (LR), Volumen de raíz (VR) a los 90 días.....	<b>56</b>
<b>8.</b> Prueba de Tukey 5 %, para comparar promedios de Factor B dosis en las variables Días a la emisión de raíces (DER), Longitud de la raíz (LR)Volumen de raíz (VR), 90 días.....	<b>59</b>
<b>9.</b> Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de tratamiento (AXB) en las variables Días a la emisión de raíces (DER) a los 30 días, Longitud de raíz (LR), Volumen de raíz (VR), a los 90 días.....	<b>61</b>

## INDICE DE GRAFICOS

### DENOMINACION

N°	PAG
1. Tipos de hormonas en las variables Número de explantes contaminados y Días a la transferencia medios de multiplicación.....	39
2. Promedio de la variable Número de explantes contaminados (NEC) a los 90 días y Días a la transferencia de medios de multiplicación a los 30 días en el cantón Guaranda, 2018.....	41
3. Promedio de tratamientos AXB de la variable Número de explantes contaminado (NEC) a los 90 días.....	43
4. Promedio de la variable Días a la transferencia a medios de multiplicación (DTMM), en el cantón Guaranda, 2018.....	44
5. Resultado de promedios del Factor A Citoquinas en la variable Número de brotes por explante (NBE) a los 90 días, en el cantón Guaranda, 2018.....	46
6. Resultado de promedios del Factor A Citoquinas en la variable Longitud del brote (LB) a los 90 días, en el cantón Guaranda, 2018.....	47
7. Resultado de promedios del Factor A Citoquinas en la variable Número de hojas del explante (NHE) a los 90 días, en el cantón Guaranda, 2018.....	47
8. Promedio de las variables evaluadas del Factor B, Numero de hojas del brote, Longitud del brote, Numero de hojas del brote, en el cantón Guaranda, 2018.....	50
9. Promedio de la variable Número de brotes por explante (NBE) en el cantón Guaranda, 2018.....	53

<b>10.</b> Promedio de la variable longitud del brote (LB) en el cantón Guaranda, 2018.....	<b>54</b>
<b>11.</b> Promedio de la variable Número de hojas del brote (NHB) en el cantón Guaranda provincia de Bolívar, 2018.....	<b>55</b>
<b>12.</b> Resultado de promedios del Factor A Citoquinas en la variable Longitud de raíz (LR) a los 90 días, en el cantón Guaranda, 2018.....	<b>57</b>
<b>13.</b> Resultado de promedios del Factor A Citoquinas en la variable Volumen de raíz (VR) a los 90 días, en el cantón Guaranda provincia de Bolívar, 2018.....	<b>58</b>
<b>14.</b> Promedio de las variables evaluadas del Factor B, Días a la emisión de raíces a los 30 días, Longitud de la raíz, y Volumen de raíz a los 90 días.....	<b>60</b>
<b>15.</b> Promedio de la variable Días a la emisión de raíces (DER) en el cantón Guaranda provincia de Bolívar, 2018.....	<b>62</b>
<b>16.</b> Promedio de la variable Longitud de raíz (LR), en el cantón Guaranda provincia de Bolívar, 2018.....	<b>63</b>
<b>17.</b> Promedio de la variable Volumen de raíz (VR), en el cantón Guaranda provincia de Bolívar, 2018.....	<b>64</b>

## INDICE DE ANEXOS

#	Contenido
<b>Anexo 1.</b>	Mapa de ubicación del ensayo
<b>Anexo 2.</b>	Base de datos de variables en estudio
<b>Anexo 3.</b>	Código de variables en estudio
<b>Anexo 4.</b>	Fotografías de la investigación
<b>Anexo 5.</b>	Glosario de términos técnicos

## RESUMEN Y SUMMARY

### Resumen

La mora de Castilla es la de mayor importancia comercial y la más cultivada en regiones comprendidas entre 1,200 a 3,000 m.s.n.m., económicamente, la mora es una de las frutas más valiosas cultivadas en el mundo entero. Las importaciones mundiales de mora han aumentado en el tiempo, el crecimiento anual promedio en el periodo 2004-2008 es de 29.6%, debido a que esta fruta se ha vuelto muy cotizada en varios países por cadenas hoteleras, supermercados, mesas familiares, etc. Lo que ha hecho que varios productores del Ecuador se motiven a cultivar y exportar. El crecimiento promedio de la mora ecuatoriana vendida al exterior en el periodo 2004-2008 es de 18.8%, en referencia a las toneladas exportadas este crecimiento en el mismo período es de 82.1%. El tema que se ha planteado en esta investigación Evaluación de plántulas de mora de castilla (*Rubus glaucus beth*) propagadas mediante multiplicación in vitro utilizando dos tipos de citoquininas en tres dosis. Los objetivos planteados son: 1 Establecer el mejor biorregulador y su dosis óptima citoquininas (*6-Benzyladenina*) y *Kinetina* para la organogénesis directa a partir de yemas apicales, en la fase de regeneración. 2 Evaluar los efectos de las distintas dosis (*6-Benzyladenina*) y *Kinetina* en la fase de proliferación de brotes. 3 Difundir la investigación mediante la publicación de este estudio en el repositorio digital de la UEB. El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología en el cantón Guaranda, Provincia de Bolívar, se realizó la extracción de explantes de mora de castilla en la comunidad de Naguan para dicha investigación, la misma que pertenece a la Universidad Estatal de Bolívar, esta investigación se desarrolló con la utilización de fitohormonas Citonininas (Bencil adenina y Kinetina) con tres dosis de 1 -3 -5 mg en un diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA). En esta investigación se registró tratamiento que sobresalían unos con otros, como el T1 (Bencil adenina 1mg), las variables registradas fueron a los 30, 60 y 90 días. En cuanto a la variable Numero de explantes contaminados (NEC) se registró con mayor contaminación al T4 (Kinetina 1mg), las variables longitud y volumen de raíz presentaron interacciones similares y de igual sobre sale el T1 siendo este el que se recomienda aplicar en las diferentes propagaciones in vitro de cultivos para la formación de nuevas plantas libres de plagas y enfermedades.

## Summary

The default of Castilla is the most important commercial and the most cultivated in regions between 1,200 to 3,000 m.s., economically, the default is one of the most valuable fruits grown in the world. The world imports of arrear have increased over time, the average annual growth in the period 2004-2008 is 29.6%, because this fruit has become highly valued in several countries by hotel chains, supermarkets, family tables, etc. What has made several producers in Ecuador are motivated to grow and export. The average growth of Ecuadorian arrears sold abroad in the period 2004-2008 is 18.8%, in reference to the tons exported this growth in the same period is 82.1%. The subject that has been raised in this investigation Evaluation of blackberry seedlings of castilla (*Rubus glaucus* beth) propagated by in vitro multiplication using two types of cytokinins in three doses. The objectives are: 1 To establish the best bioregulator and its optimal dose cytokinins (6-Benzyladenine) and Kinetin for direct organogenesis from apical buds, in the regeneration phase. 2 Evaluate the effects of the different doses (6-Benzyladenine) and Kinetina in the bud proliferation phase. 3 Disseminate the research by publishing this study in the UEB digital repository. The research work was carried out in the biotechnology laboratory in the canton of Guaranda, Province of Bolívar, extraction of expira de mora de castilla was carried out in the community of Naguan for this research, which belongs to the State University of Bolívar, this research was developed with the use of phytohormones Citonininas (Bencyl adenine and Kinetina) with three doses of 1 -3 -5 mg in a design of Complete Blocks Randomly (DBCA). In this investigation treatment was recorded that stood out with each other, such as T1 (Bencyl adenine 1mg), the variables recorded were at 30, 60 and 90 days. Regarding the variable Number of contaminated explants (NEC), T4 (Kinetin 1mg) was more contaminated, root length and volume variables showed similar interactions, and T1 was the same as it was recommended to apply in different in vitro propagations of crops for the formation of new plants free of pests and diseases.

## I. INTRODUCCIÓN

La mora de Castilla es la de mayor importancia comercial y la más cultivada en regiones comprendidas entre 1,200 a 3,000 m.s.n.m., económicamente, la mora es una de las frutas más valiosas cultivadas en el mundo entero. (Casaca, A. 2005)

Las importaciones mundiales de mora han aumentado en el tiempo, el crecimiento anual promedio en el periodo 2004-2008 es de 29.6%, debido a que esta fruta se ha vuelto muy cotizada en varios países por cadenas hoteleras, supermercados, mesas familiares, etc. Lo que ha hecho que varios productores del Ecuador se motiven a cultivar y exportar. El crecimiento promedio de la mora ecuatoriana vendida al exterior en el periodo 2004-2008 es de 18.8%, en referencia a las toneladas exportadas este crecimiento en el mismo período es de 82.1%. (Ramírez, T. *et al* 2009)

La mora de Castilla registra problemas de productividad en Ecuador, en parte esto se ha visto afectado por el uso de sistemas de propagación tradicionales. Además, con estos métodos el número de plantas homogéneas que se pueden obtener de cada 2 planta madre es reducido, al propagarse obtiene un número limitado de plantas; mientras que por el método de cultivo de tejidos *in vitro* se obtendría el doble de plantas y mucho más por el sistema de organogénesis, ya que se obtendrían un gran número de nuevos brotes a partir de cantidades mínimas de tejido. (Patiét, C. *et al* 2004)

En Mora, existen algunos reportes de micro propagación *in vitro*, Arbeláez (2008) publicó el protocolo de micro propagación de (***Rubus glaucus Benth***) sin aguijones en medio sólido y por inmersión temporal; en la mayoría de los casos se trata de regeneración indirecta (formación previa de callos), donde la variación somaclonal es más frecuente. Sin embargo, no existen estudios en organogénesis directa, la misma que es de gran utilidad para propagar plantas élites sin generar variabilidad genética. Por la necesidad de implementar un método eficaz de propagación en mora de Castilla, en esta investigación realizada en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente, se buscara

desarrollar un protocolo en organogénesis directa in vitro a partir de ex plantas, este proceso ofreció altas tasas de multiplicación en un tiempo corto y la obtención de cultivos sanos, libres de virus y agentes patógenos, así como una rápida reproducción y crecimiento de brotes y raíces en forma sucesiva, uniformidad en el cultivo, disponibilidad del material vegetal a lo largo de todo el año, ayudando de esta manera al desarrollo y competitividad en el sector, y también como base para futuras investigaciones.

Los objetivos que se establecieron en esta investigación son:

- Establecer el mejor biorregulador y su dosis óptima citoquininas (*6-Benzyladenina*) y *Kinetina* para la organogénesis directa a partir de yemas apicales, en la fase de regeneración.
- Evaluar los efectos de las distintas dosis (*6-Benzyladenina*) y *Kinetina* en la fase de proliferación de brotes.

## **II. PROBLEMA**

La agricultura enfrenta un sin número de nuevos retos debido a los cambios en el sistema de producción, la misma que exige una mayor capacidad competitiva en cuanto a calidad, rendimientos y cuidado del medio ambiente.

La utilización de nuevas tecnologías que buscan obtener altos rendimientos sin que estas afecten el ecosistema. En Ecuador, la mora de castilla en general se cultiva entre 1 800 y 3 000 metros sobre el nivel del mar en 6 000 hectáreas. De esas, 3 600 están en Tungurahua, 1 500 en Bolívar y el resto en las provincias de Cotopaxi, Pichincha, Imbabura y Carchi.

En la provincia de Bolívar los agricultores buscan cultivar plantas certificadas, libre de plagas y enfermedades para de una u otra manera puedan entregar su producto de buena calidad y gran cantidad de producción, es por esto esta razón que muchas de las empresas o instituciones privadas realizan propagación in vitro de mora de castilla para garantizar la producción necesaria de agricultores, evitando destrucciones a largo plazo.

Debido a la falta de plantas certificadas en el país, se hace necesario buscar alternativas que permitan propagar plantas de mora libres de patógenos. Lo que ha llevado a considerar al uso de cultivos in vitro como una herramienta para obtener plantas certificadas de calidad, se han hecho algunos intentos de micro propagación, reportando considerables avances en esta técnica, pero no se han obtenido los resultados deseados, por lo que es necesario realizar investigaciones a profundidad.

Tomando en cuenta que por medio de la multiplicación in vitro se puede obtener en un corto período un número masivo de plantas libres de plagas y enfermedades, a partir de cualquier órgano, tejido o meristema de la planta. es una buena alternativa para la propagación masiva de dicha especie, luego de superar las dificultades que implica el establecimiento del cultivo in Vitro de cualquier especie vegetal.

En el cantón Guaranda en especial en la granja experimental de Naguam, se cultivan plantas de mora de castilla, de las cuales se extrajo el explante para la multiplicación in vitro, esta actividad se realizó con el fin de adquirir nuevas plantas libre de patógenos y susceptible a plagas y enfermedades. La micropropagación son permite optimizar los procesos de propagación mejorando la calidad, garantizando que serán libres de enfermedades como en la actualidad la que afecta principalmente a la mora de castilla es la Pudrición del fruto o moho gris (***Botristis cinérea Pers. Ex Fr***) es por esto que por medio de esta investigación al realizar multiplicación in vitro se garantiza la producción de plantas de mora libres de plagas y enfermedades a largo plazo en esta zona en estudio.

### III. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Origen

La mora de castilla (***Rubus glaucus Benth***) es una planta de origen silvestre, fue encontrada por el investigador Popenoe, creciendo en estados silvestres individualmente o formando grupos con otras variedades. Se encuentran diseminadas en casi todo el mundo excepto en las zonas desérticas. *Rubus glaucus* es originaria de las zonas altas tropicales de América principalmente en Colombia, Ecuador, Panamá, Guatemala, Honduras, México y Salvador. (Ledin, B. 2005)

#### 3.2. Clasificación botánica

La mora es una fruta perteneciente al grupo de las bayas; es muy perecedera, rica en vitamina C y con un alto contenido de agua. Es originaria de las zonas altas tropicales de América principalmente en Colombia, Ecuador, Panamá, Guatemala, Honduras, México y Salvador. El género *Rubus* es uno de los de mayor número de especies en el reino vegetal. Se encuentran diseminadas en casi todo el mundo excepto en las zonas desérticas. Se conocen numerosas especies de moras o zarzamoras en las zonas altas de América Tropical, principalmente en Ecuador, Colombia, Panamá, los países de Centroamérica y México. La planta de mora comienza fructificar a los 6 o 8 meses después del trasplante. Dependiendo del manejo y cuidado de la plantación, la planta presenta un período de 10 o más años de producción, la misma que aumenta a medida que crece y avanza en edad el cultivo. (INFOAGRO. 2018)

La mayor diferencia entre estos géneros está en el fruto, ya que las moras tienen la apariencia de una fresa y su color es negro, rojo y púrpura cuando está madura. Se considera que en el mundo hay unas 300 especies de importancia relativa según la aceptación comercial que tienen en los diferentes territorios. La variedad Brazos, que se utilizará en el proyecto, se caracteriza por ser una planta vigorosa de crecimiento semirrecto y de rendimientos altos. (Molina, C. 2003)

### 3.3. Clasificación taxonómica

Reino:	Vegetal
División:	Antófila
Clase:	Dicotiledónea
Subclase:	Arquiclamídea
Orden:	Rosales
Familia:	Rosásea
Género:	Rubus
Especie:	Glaucus
Nombre científico:	<i>Rubus graucus</i> Benth

### 3.4. Morfología

Es una planta de vegetación perenne, de porte arbustivo semierecto, conformada por varios tallos espinosos que pueden crecer hasta tres metros. Las hojas tienen tres folíolos, ovoides de 4 a 5 centímetros de largo con espinas ganchudas. Los tallos son espinosos con un diámetro entre 1 a 2 centímetros y de 3 a 4 metros de longitud. Tanto los tallos como las hojas están cubiertas por un polvo blanquecino. Los peciolo también tienen espinas, de color blanco y son de forma cilíndrica. En la base de la planta se encuentra la corona de donde se forman los tallos la cual está conformada por una gran cantidad de raíces superficiales. El sistema radicular es profundo, puede llegar a profundizar más de un metro dependiendo del suelo y el subsuelo. (<https://www.eumed.net/rev/oel/2018/02/produccionmoraagricultores.html>)

#### 3.4.1. Tallo

Los tallos están cubiertos por espinas curvas, son de longitud variable entre 3 y 4 m y hasta 2 m de alto, mide de 1,5 a 2,5 cm de diámetro, pueden ramificarse y emiten constantemente brotes en la base. El color del tallo varía del cenizo al rojo, algunas están cubiertas de un polvillo azul blanquecino y otros de un color verde y café oscuro, cuando están maduros son leñosos. (Giraldo, M. 2006).

### **3.4.2. Hojas**

Las hojas son compuestas, trifoliadas, de peciolo blancuzco, cilíndrico y cubierto de espinas, que también se hallan en nervios, en la cara inferior de la lámina, Los foliolos son ovoides, de 5 a 12 cm, de largo, acuminados y aserrados, verde oscuro en el haz, y blanquecinos en el envés. (INFOAGRO. 2018)

### **3.4.3. Flores**

Las flores son compuestas y actinomorfas, típicamente periginas, son blancas, de 2.0 a 2.5 cm de diámetro y se disponen en racimos en las puntas de las ramas, o a veces, en toda la rama, poseen 5 sépalos permanentes y 5 pétalos. Poseen muchos estambres y carpelos libres unidos al receptáculo, cada carpelo está compuesto de 1 ovario, 2 óvulos y 1 pistilo largo. Las ramas florecen en racimos terminales. (Cerdas, M. 2005)

### **3.4.4. Fruto**

El fruto es compuesto y agregado, está formado por 70 a 100 drupas que se adhieren al receptáculo y, dentro de cada drupa hay una semilla y cada fruto posee de 100 a 120 semillitas. Los frutos son de forma esférica a elipsoide, pueden ser de tamaño grande, mediano o pequeño, maduran de manera dispareja porque la floración no es homogénea. Miden de 1,5 a 2,5 cm de largo y de 1,5 a 2,0 cm de diámetro. Cuando maduran, tienen un color que va de rojo a purpura o rojo oscuro. La producción de frutos es continua, aunque se presentan épocas de mayor producción en intervalos de 5 a 6 meses. (Casaca, A. 2005)

### **3.4.5. Raíz**

Las raíces se distribuyen en los primeros 30 cm del suelo y su longitud va desde 50 a 120 cm. La raíz se forma a partir del cuello cicatriza, en las estacas y acodos y, además, ésta permite la propagación al presentar yemas vegetativas capaces de activarse produciendo nuevos brotes. (Giraldo, M. 2005)

### **3.5.Propagación**

La mora de castilla se propaga tanto de forma asexual como sexual. Sin embargo, actualmente su propagación es principalmente asexual, dentro de la cual existen los siguientes tipos de propagación. (Marulanda, A. *et al.* 2005)

#### **3.5.1. Por estacas**

La propagación por estacas consiste en cortar secciones de tallo de 35 cm de longitud, con un diámetro aproximado de 1 cm y debe tener entre 3 a 4 yemas. La estaca es directamente plantada en una funda con sustrato, utilizando hormonas para enraizamiento. Se obtendrá la planta lista para trasplante en 60 días aproximadamente. (Cruz, F. 2012)

#### **3.5.2. Acodo de punta o terminal**

Esta forma de multiplicación consiste en enterrar las puntas de los tallos de por lo menos 1,5m de longitud, sin desprenderlas de la planta madre, en una maceta con un sustrato rico en materia orgánica. A los 60 días se corta el tallo y la planta está lista para ser trasplantada. (Casaca, A. 2005)

#### **3.5.3. Acodo rastro y terminal**

En este método se obtienen la mayor cantidad de plántulas. Se seleccionan ejes primarios que tengan cerca de 2m de longitud, el tallo se agobia hasta colocarlo horizontalmente al ras del suelo, colocándose hasta tres porciones de tierra sobre el tallo, además se entierran todos los ápices del tallo, tanto el principal como los secundarios. Aproximadamente a los 60 días se separan las plántulas y se trasplantan. (Castro, R. 2007)

#### **3.5.4. Propagación por raíz o fragmentos de tallo subterráneo**

Para realizar este tipo de propagación se deben obtener fragmentos de tallo subterráneo, de plantas seleccionadas, los mismos que serán divididos en secciones de 10 a 15 cm de longitud, 1 a 1,5 cm de diámetro y con 2 a 3 yemas. Estas secciones

se siembran en fundas con sustrato, en 45 a 60 días se obtendrán plantas listas para el trasplante. (Cerdas, M. 2005)

### **3.6. Cultivo de tejidos in vitro**

#### **3.6.1. Generalidades**

El cultivo in vitro se basa en la “totipotencia celular”, esto es la capacidad de las células para regenerarse en una planta completa. Este tipo de propagación se realiza en estrictas condiciones de asepsia, con medios de cultivo nutritivos y condiciones artificiales controladas, simulando el medio de la planta madre.

Existen diversas metodologías de cultivo de tejido *in vitro*, de igual manera existen diferentes partes de las plantas que son útiles para el mismo. Así en el presente estudio se utilizó la siguiente metodología. (Olmos, S. *et al* 2012)

#### **3.6.2. Cultivo de tejidos**

Con el fin de obtener una propagación de forma rápida, a gran escala y de plantas sanas, libres de bacterias y hongos; la micro propagación y el cultivo de meristemas, son excelentes opciones para la multiplicación del cultivo de mora de castilla.

El cultivo de tejidos, como técnica, consiste esencialmente en aislar una porción de planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones física e química apropiadas para que la célula expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario además adoptar procedimiento de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana. El laboratorio de cultivo de tejidos debe disponer de un área destinada al establecimiento, crecimiento y multiplicación de la planta producida; esta área es especialmente necesaria en los laboratorios de investigación y desarrollo y en los de producción comercial. (TECA. 2018)

En la propagación *in vitro* de mora de castilla, recomienda el uso combinado de citocininas y giberelinas para una mayor tasa de multiplicación indicando que se puede reducir la concentración de la citocininas hasta 1ppm, sin embargo, no llega a la fase de enraizamiento y adaptación a sustrato. (Muralanda *et al.* 2005)

### **3.6.3. Cultivo de meristemas y yemas axilares**

Se inició en los años 60, con el cultivo aséptico de los brotes y meristemas de la orquídea *Cymbidium sp.*, que cortados y sembrados correctamente in vitro, poseían la capacidad de producir protocormos que originaron en una plántula. Desde entonces, en diversos cultivos, se utiliza éste sistema de propagación a partir de una punta de brote y meristemas, para obtener plantas completas o brotes múltiples. En cualquier caso, se espera la formación de ramas axilares, que puedan ser separadas y enraizadas, teniendo con este sistema una fuente permanente de yemas axilares capaces de producir una plántula, de forma rápida y en grandes cantidades (Enrique, C. 2012)

### **3.6.4. Medios de cultivo y componentes**

El medio de cultivo es el sustrato donde se va a colocar al explante seleccionado, tienen diversos componentes generales y específicos que dependen del objetivo que se persiga en el cultivo. El medio de cultivo cumple con dos funciones principales: proporciona soporte físico y todos los nutrientes necesarios para el desarrollo del explante. (González, R. 2003)

La selección del medio es vital para el cultivo de tejidos, frecuentemente la modificación del mismo es necesaria para obtener diferentes tipos de respuestas en el crecimiento de un explante. El cultivo de tejidos precisa de medios relativamente complejos, constituidos por sales inorgánicas y compuestos orgánicos como reguladores de crecimiento, vitaminas, un carbohidrato, hexitales y un agente gelificante. (Roca, W. 2013)

Los medios de cultivo constituyen un elemento fundamental para el cultivo in vitro de células, tejidos y órganos para lograr el desarrollo de los mismos. Los medios de cultivo tienen una serie de componentes generales y específicos cuya presencia y concentración estará en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización. Los medios de cultivo están constituidos por sustancias minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares, reguladores del crecimiento y otros elementos.

El cultivo de células, tejidos y órganos de la planta in vitro se realiza en medios de cultivos artificiales, lo cuales proporcionan los nutrientes necesarios que la planta toma de la tierra en su habitat natural y precisamente el éxito de este tipo de cultivo está influenciado grandemente por la naturaleza del medio de cultivo utilizado y otros factores ambientales. (TECA. 2018)

### **3.6.5. Componentes inorgánicos del medio de cultivo**

Los medios de cultivo están constituidos por componentes inorgánicos, los cuales son suministrados en cantidades relativamente grandes (macronutrientes) y otros añadidos en menor cantidad (micronutrientes). Dentro de los macronutrientes, se encuentran iones de nitrógeno (N), potasio (K), calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg) y azufre (S).

El nitrógeno se adiciona al medio de cultivo en forma de nitrato o iones amonio, o la combinación de ambos iones, el sulfato de magnesio ( $Mg SO_4 \cdot 7H_2O$ ) satisface tanto el requerimiento de magnesio como el de azufre, el fósforo puede adicionarse en cualquiera de las formas  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  ó  $KH_2PO_4$ , el potasio es un catión que se agrega en forma de KCl,  $KNO_3$ , ó  $KH_2PO_4$ , el calcio se adiciona con  $Ca Cl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  o la forma anhidra de cualquier sal y el cloro se presenta en forma de KCl ó  $CaCl_2$ . (<http://biotecnologia-itca.blogspot.com/2012/02/2-1-4-componentes-del-medio-de-cultivo.html>)

Los micronutrientes, que son añadidos a los medios de cultivo son hierro (Fe), níquel (Ni), cloro (Cl), manganeso (Mn), cinc (Zn), boro (B), cobre (Cu), y molibdeno (Mo). Estos elementos junto con el carbono (el C), oxígeno (O) e hidrógeno (H) constituyen los 17 elementos esenciales. Estos micronutrientes, aunque son requeridos en menor cantidad son necesarios para una adecuada actividad metabólica de las células vegetales. El Fe y el Mn son esenciales para la síntesis de clorofila y la función de los cloroplastos. El Fe es requerido para la formación de precursores de la clorofila y es un componente de los citocromos, ferredoxina y leghemoglobina, esta última es esencial en la fijación de nitrógeno por las plantas leguminosas. El Mn es necesario para el mantenimiento de la

ultraestructura y el proceso fotosintético. Los elementos Cu y Zn son requeridos para la oxidación e hidroxilación de compuestos fenólicos. El Zn está relacionado con la síntesis de triptófano, precursor del ácido indolacético (AIA) y ejerce control sobre las ribonucleasas lo que permite mantener la síntesis proteica en caso de estrés ambiental (medio de cultivo). El Cu, además es un componente de la Plastocianina que es esencial en el funcionamiento del transporte electrónico de la fotosíntesis y es activador de otras enzimas como la oxidasa del ácido ascórbico (Vitamina C), tirosinasa, lacasa, fenolasa y citocromoxidasa, esta última forma parte de la cadena de transporte electrónico del proceso respiratorio. El Mo forma parte de las nitratorreductasas de las plantas y nitrogenasas en leguminosas y bacterias fijadoras de nitrógeno. El boro (B) es necesario para el mantenimiento de la actividad meristemática, está involucrado en la síntesis de bases nitrogenadas, en particular uracilo y adenina y por ello aumenta los niveles de citocininas y ácidos nucleicos. Lugo el Fe es añadido en forma de quelato cuyas moléculas son capaces de retener un ión de un metal con varias uniones químicas formando un anillo complejo (un quelato) como el EDTA (ácido etilendinitrotetraacético), que utilizado en bajas concentraciones estimula el crecimiento al hacer disponible en bajas cantidades este elemento. (Castillo, A. 2016)

El medio de cultivo más utilizado es la formulación de las sales Murashige y Skoog (1962) el cual fue desarrollado inicialmente para el crecimiento de callos de tabaco y en la actualidad se emplea como medio de cultivo basal para un grupo importantes de plantas de interés para la alimentación y con fines ornamentales. Sales minerales del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962)

#### **MS (Murashige and Skoog, 1962) (g/l)**

(NH<sub>4</sub>) NO<sub>3</sub> 1.650

KNO<sub>3</sub> 1.900

CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0.440

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.370

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.170

FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.0278

Na<sub>2</sub>EDTA. 2H<sub>2</sub>O 0.0372  
MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0.0169  
ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.0086  
H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.0062  
KI 0.00083  
Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0.00025  
CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0.000025  
CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0.000025  
Mioinositol 0.100  
Tiamina HCl 0.0001  
Acido nicotínico 0.0005  
Piridoxina HCl 0.0005  
Glicina 0.002 (<https://www.probiotek.com/productos/reactivos/murashige-and-skoog-ms-medium.html>)

**Sales minerales DKW modificado (g/l)**

(NH<sub>4</sub>)NO<sub>3</sub> 1.416  
Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 3H<sub>2</sub>O 1.811  
(1.960 si es 4 H<sub>2</sub>O)  
CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.147  
MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.74  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.258  
FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.00676  
Na<sub>2</sub> EDTA 2H<sub>2</sub>O 0.0908  
K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.56  
Mn SO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 0.0338  
Zn SO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.0212  
BO<sub>3</sub>H<sub>3</sub> 0.0124  
KI 0.00166  
Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.0005  
Cu SO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 0.00005  
Co Cl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 0.00005

Mioinositol 0.1  
Tiamina H Cl 0.001  
Ác. nicotínico 0.001  
Piridoxina. HCl 0.001  
Biotina D(+) 0.00001  
Glutamina (base libre ) 0.001  
L-Cisteína H Cl 0.001  
Pantotenato de Ca 0.1(<http://alvaradobiotech.blogspot.com/2013/02/tarea-medios-de-cultivo.html>)

### **Micronutrientes mg/L**

FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 27,8  
Na<sub>2</sub>EDTA 37,3  
H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 6,2  
MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O 22,3  
ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 8,6  
Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,25  
CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,025  
CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,025  
KI 0,83 (<https://www.probiotek.com/productos/reactivos/murashige-and-skoog-ms-medium.html>)

### **Vitaminas mg/L**

myo- Inositol 100  
Tiamina HCl 0,1  
Acido nicotínico 0,5  
Glicina 2, 0  
Piridoxina HCl 0,5  
Sacarosa 30 g/ltr  
Agar 7.5 g/ltr

### 3.6.6. Componentes orgánicos del medio de cultivo

Dentro de los componentes orgánicos del medio de cultivo se encuentran carbohidratos, vitaminas, aminoácidos, extractos naturales y reguladores del crecimiento vegetal:

#### 3.5.6.1. Carbohidratos

La nutrición que es desarrollada en las condiciones *in vitro* a partir en los diferentes órganos y tejidos son ampliamente heterótrofos con respecto al carbono debido a la ausencia o insuficiencia de asimilación cloroflica, por lo cual resulta indispensable añadir azúcares a los medios de cultivo como fuente de energía y reguladores osmóticos. La sacarosa es el azúcar empleado universalmente. Le siguen en importancia glucosa, maltosa, rafinosa, fructosa y galactosa entre otros. (Cano, S. 2006)

#### 3.6.6.2. Vitaminas

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades. Las vitaminas más empleadas son:

- **Tiamina (vitamina B1):** se añade como hidrocloreuro de tiamina y constituye una vitamina esencial para el crecimiento de células vegetales. Es una coenzima de la descarboxilación de los cetoácidos piruvato y  $\alpha$ -cetoglutarato y es esencial para el crecimiento radical pues interviene en la síntesis de citocininas.
- **Ácido Nicotínico:** forma parte de las coenzimas NAD y NADP que intervienen en la transferencia de hidrógeno, además de ser precursor el triptófano y por tanto tiene un efecto sinérgico con el AIA en la producción de raíces y ejerce acción inhibitoria en el desarrollo de yemas axilares.
- **Piridoxina (Vitamina B6):** Es añadida como hidrocloreuro de Piridoxina (Piridoxina-HCl). Participa como coenzima en el metabolismo de los

aminoácidos, entre ellos el triptófano, precursor de AIA y ácido nicotínico, además de favorecer la formación de raíces.

- **Myo-inositol:** No es propiamente una vitamina, sino un azúcar-alcohol. Tiene un efecto sobre la proliferación de tejidos y sobre la activación de la organogénesis.
- **Ácido ascórbico y ácido cítrico:** Son añadidos a los medios de cultivo en ocasiones no como vitaminas sino como antioxidantes para evitar el oscurecimiento de determinados tejidos. (Lagos, C. 2013)

### **3.6.6.3. Aminoácidos y extractos naturales**

Los aminoácidos favorecen la proliferación de callos y la organogénesis. Los efectos obtenidos mediante el aporte de aminoácidos parecen muy variables según la especie y el tipo de morfogénesis estudiada. Dentro de ellos se encuentran la glutamina, L-arginina, L-cisteína entre otros. (Castillo, A. 2016)

Los extractos naturales estimulantes son numerosos productos de composición variable y no bien definida. Dentro de ellos se encuentran extracto de levadura, hidrolizado de caseína, peptona y agua de coco (más utilizado) entre otros.

### **3.6.6.4. Agentes gelificantes**

El agar se ha convertido en el material de soporte más ampliamente usado, pues provee el medio de un excelente gel húmedo que sirve como soporte al explante. También es utilizado el gelrite o fitagel.

### **3.6.6.5. Agua**

Es de vital importancia la calidad del agua empleada para realizar los medios de cultivo la cual debe ser destilada. Siempre que se realicen trabajos con cultivo de tejidos y células in vitro el agua a usar debe tener la mayor calidad posible (desionizada), debiendo estar entre 0.5 a 2 mS/ cms.

### **3.7.Reguladores del crecimiento vegetal**

Los reguladores del crecimiento vegetal se agrupan en cinco categorías: auxinas, citokininas, giberelinas ácido abscísico y etileno. Además de estas sustancias naturales de la planta existen otros productos que pueden utilizarse como reguladores del crecimiento para el cultivo *in vitro*. (Iáñez, E. 2018)

Principales reguladores del crecimiento empleados en cultivo de tejidos.

#### **Auxinas**

- AIA: Ac. indol 3 – acético
- ANA: Ac. naftalenacético
- AIB: Ac indol 3-butírico
- 2,4 D: Ac. 2,4 diclorofenoxiacético
- Picloram
- Dicamba

#### **Citokininas**

- BAP: 6 - bencilaminopurina
- KINETINA: 6 - furfurilaminopurina
- Z: Zeatina

#### **Giberelinas**

- **GA<sub>3</sub>: Acido. giberélico**

#### **Etileno ácido abscisico poliaminas**

- Putrescina
- Espermidina
- Espermina

#### **Brasinoesteroides**

- Análogos Biobras 6
- Biobras 16

#### **Oligosacarinas**

- Pectimorf: oligogalacturónido DPS (12-14) (Iáñez, E. 2018)

Los reguladores del crecimiento vegetal son moléculas orgánicas difusibles que modulan procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo eficaces a bajas concentraciones internas, cercanas a 1 mM. A medida que se fueron identificando un mayor número de reguladores de crecimiento y se fueron estudiando sus efectos y concentraciones endógenas se hizo evidente que cada uno de ellos no sólo influye en las respuestas de muchas partes del vegetal, sino que tales respuestas dependen de la especie, del órgano del vegetal, del estado de desarrollo, de las concentraciones endógenas y exógenas, de las interacciones entre reguladores de crecimiento y de diversos factores ambientales. Por lo tanto, es riesgoso generalizar acerca de los efectos de las reguladoras de crecimiento sobre los procesos de crecimiento y desarrollo en un tejido u órgano vegetal en particular. (Racines, M. *et al* 2012)

Los reguladores de crecimiento están conformados por hormonas, que son compuestos orgánicos sintetizados por plantas superiores y otros de tipos sintético; ambos tienen una actividad semejante, distribuyen los compuestos que la planta biosintetiza y, determinan el crecimiento de los órganos de la planta en concentraciones muy por debajo de otros compuestos. (<http://www.redagricola.com/cl/reguladoresdecrecimientoybioestimulantes.html>)

### **3.7.1. Auxinas**

Es una familia de sustancias químicas que tienen en común la capacidad de regular el crecimiento, la división celular y la diferenciación de raíces en los cultivos *in vitro*. En las plantas, las auxinas intervienen en el tropismo a la gravedad y a la luz, la dominancia apical, el crecimiento de las partes florales y la diferenciación de los tejidos vasculares (Davies, 1995). Las auxinas más utilizadas son el AIA (ácido indol-3-acético), el ANA (ácido  $\alpha$ -naftalenacético), el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), el AIB (ácido indolbutírico), el pCPA (ácido p-clorofenoxiacético) y el BTOA (ácido benzotiazol-2oxiacético). En cuanto al mecanismo de acción de las auxinas, se conoce que ellas aumentan la plasticidad de la pared celular, lo que permite la expansión de la célula ([http://www.euita.upv.es/varios/biologia/temas/tema\\_14.html](http://www.euita.upv.es/varios/biologia/temas/tema_14.html))

La elongación inducida por auxinas se inicia al unirse esta hormona al receptor, probablemente localizado en la cara externa de la membrana plasmática, lo que desencadena una cascada de eventos que determinan la secreción de protones por la célula. Como resultado de esta acidificación, se activan proteínas que rompen los enlaces cruzados entre las moléculas de celulosa y permiten la elongación cuando aumenta la presión de turgencia. Durante este proceso se han detectado cambios en las concentraciones del trifosfato de inositol y del calcio iónico citoplasmático, los que actuarían como segundos mensajeros. (Cano, S. 2006)

### **3.7.2. Citocininas**

Son derivados de la adenina que promueven la división celular. Entre ellas cabe mencionar las siguientes: BA (bencil adenina), K (cinetina o 6-furfuril aminopurina), Zea (zeatina) y 2-iP (N-isopentenil adenina). Las dos primeras son citocininas sintéticas y las dos últimas naturales. Las citocininas in vitro incrementan la tasa de división celular, el transporte de solutos hacia las hojas, semillas, flores y frutos y producen un retardo de la senescencia de las hojas. (Sergrein, M. 2017)

La eficiencia comparativa de dos citocininas (BA y 2-iP) en igual concentración sobre la propagación in vitro de *Paeonia suffruticosa* fue estudiada por Bouza et al. (1993). Los explantos cultivados en BA desarrollan nuevas hojas y yemas axilares asegurando una buena multiplicación vegetativa, mientras que el desarrollo de los explantos cultivados en 2-iP fue escaso. Las respuestas anteriores fueron correlacionadas con los niveles endógenos de AIA y ABA (ácidos abscísico), observando que altas concentraciones de BA se asociaron con baja producción de AIA y que el ABA se produce más tardíamente en los explantos tratados con BA que en los cultivados con 2-iP. Estos resultados indican que un mismo tejido reacciona de modo diferente ante el estímulo hormonal, aun cuando se trate de compuestos relacionados. La inclusión de citocininas en el medio de cultivo permite formar callos en varias especies vegetales, aunque principalmente induce que regiones meristemáticas multicelulares se diferencien en estructuras organizadas. La proporción entre auxinas y citocininas permite regular la organogénesis o la

desdiferenciación, por lo que se deben programar las concentraciones de auxinas y citocininas a través de diseños factoriales para cada especie y variedad vegetal y según el objetivo del trabajo. En general, cuando la relación auxina/citocinina es alta se forman raíces, cuando es baja se producen vástagos y con relaciones cercanas a 1 se producen callos. (<https://www.horticultivos.com/nutricion/aplicacion-hormonas-vegetales.html>)

### **3.7.3. Giberelinas**

Las giberelinas (GAs) constituyen una familia de compuestos químicos tetracíclicos diterpenoides que regulan varios procesos del crecimiento y desarrollo como la germinación de semillas, la elongación de tallos, el desarrollo de raíces y la floración (Gray & Estelle, 1998). Se han identificado 64 GAs exclusivos de plantas superiores, 12 GAs que están presentes sólo en hongos del género *Gibberella* y 13 tipos de GAs que se aíslan de ambos grupos. Tanto en *Gibberella* como en angiospermas se han aislado varios tipos de GAs simultáneamente. Las GAs se sintetizan a partir de ácido mevalónico en tallos jóvenes y en semillas en desarrollo. Permiten superar la latencia de semillas y brotes, promueven la floración y retardan la senescencia. Los variados efectos de las giberelinas sugieren que tienen más de un sitio de acción primario. Así, si sólo se considera la elongación del tallo en plantas completas, ésta es el resultado de al menos tres acontecimientos coadyuvantes:

- Estímulo de la división celular de las células meristemáticas del ápice del tallo.
- Promoción del hidrólisis de almidón, fructanos y sacarosa originando monosacáridos que proporcionen energía vía respiración, contribuyan a la formación de la pared celular y disminuyan el potencial hídrico de la célula.
- Incremento de la plasticidad de la pared celular, permitiendo la elongación celular (Salisbury & Ross, 1994). A pesar de la gran cantidad de efectos fisiológicos de las GAs, su uso en los medios de cultivo no está muy difundido. En algunos casos, como en cultivos de zanahoria, se ha demostrado que el GA3 afecta más la división que el crecimiento celular

(Krikorian, 1995). En cultivos productores de metabolitos secundarios puede afectar la producción tanto en los niveles como en su concentración relativa; tal es el caso de los cultivos de raíces transformadas de *Brugmansia candida*, en los cuales el suplemento de GA3 reduce la acumulación de alcaloides del tropano y altera significativamente la concentración relativa. (Ramirez, T. *et al* 2009)

#### **3.7.4. Ácido Abscísico**

El ácido abscísico (ABA) es un regulador de crecimiento cuya tasa de biosíntesis se modifica significativamente frente al estrés fisiológico ocasionado por falta de agua, salinidad del suelo, bajas o altas temperaturas, etc. El ABA provoca respuestas que ayudan a proteger a las plantas contra estos factores, como el cierre de estomas y la producción de proteínas protectoras. También participa en la embriogénesis normal y en la formación de proteínas de almacenamiento en semillas. Estas características pueden utilizarse en cultivo *in vitro* para producir metabolitos de reacción al estrés, para retrasar el crecimiento y para moderar los efectos de auxinas y citocininas. (Castillo, A. 2016)

#### **3.7.5. Etileno**

El etileno es un compuesto gaseoso reconocido como hormona de maduración de los frutos pero que además regula diversos procesos fisiológicos como la germinación de las semillas, la senescencia de hojas y flores, la abscisión de hojas y frutos y la floración de algunas especies. El modo de acción del etileno no es aún conocido, aunque se han detectado cambios en la expresión genética de algunas proteínas ([http://www.infoagro.com/frutas/reguladores\\_crecimiento.html](http://www.infoagro.com/frutas/reguladores_crecimiento.html)).

Es producido en cultivos *in vitro* de todo tipo y se acumula en la fase gaseosa de los recipientes de cultivo en concentraciones variables según la clase y peso del tejido, el volumen y la cubierta del recipiente y las condiciones de cultivo. La acumulación de etileno induce la formación y el crecimiento de callos en algunos cultivos *in vitro*, como en tabaco, dalia y tomate, mientras que inhibe o tiene escaso efecto en la desdiferenciación de otras especies. En la morfogénesis se han

observado efectos variables en diferentes especies, tanto estimulantes como inhibidores o sin efecto en la formación de vástagos y raíces. ([http://www.infoagro.com/frutas/reguladores\\_crecimiento.html](http://www.infoagro.com/frutas/reguladores_crecimiento.html))

### **3.8. Medios de cultivo.**

El medio de cultivo puede ser líquido, sólido o semi-sólido, según el contenido del soporte, para solidificar y mantener el tejido en la superficie, el agar es la sustancia más utilizada en el cultivo in vitro. (González, R. 2003)

Generalmente se utiliza el agar en concentraciones de 0,6 a 0,8 %. Concentraciones menores a 0,4% y con un pH bajo no cuajan, mientras concentraciones muy altas, mayores a 1%, dificulta a los explantes establecer contacto con el medio. (Pierik. 1990) Además, altas concentraciones de agar pueden afectar negativamente el crecimiento in vitro. (Patiet, C. 2004)

#### **3.8.1. Carbohidratos o azúcares**

Un medio se encuentra formado por sustancias orgánicas como los carbohidratos o azúcares, entre los cuales se hallan la glucosa, fructosa, pero principalmente en el cultivo in vitro se utiliza la sacarosa, ya que ésta se sintetiza y transporta de forma natural en las plantas, cuya función principal es ser fuente de energía, siendo esencial para el crecimiento y desarrollo in vitro, puesto que en éstas condiciones el tejido verde no es suficientemente autotrófico (Kenneth y Torres, 1989 citados por Cañizares, 1998; Pierik, 1990). Es decir, las células verdes en cultivo, generalmente no son activas fotosintéticamente y requieren fuentes de carbohidratos. En el cultivo celular se utiliza comúnmente entre 2-5% de sacarosa o glucosa (Suquillo, V. 2012)

#### **3.8.2. Vitaminas y aminoácidos**

Las vitaminas tienen funciones catalíticas en las reacciones enzimáticas, además favorecen el crecimiento del explante y su ausencia podría ser un factor limitante. Entre las vitaminas utilizadas para el cultivo in vitro están: tiamina, ácido nicotínico, piridoxina. Se utilizan también el ácido cítrico y el ácido ascórbico, pero

no como vitaminas sino como antioxidantes; una de las prácticas más comunes para contrarrestar el efecto de la oxidación fenólica, es agregar antioxidantes al medio de cultivo, los que son inhibidores de la polifenoloxidasa o absorbentes. (González, R. 2003)

Los aminoácidos favorecen la formación de callos, y la mezcla de los mismos parece presentar efectos sinérgicos ya que estimula la proliferación de callos y la organogénesis. (González, R. 2003)

### **3.9. Cultivo in vitro**

#### **3.9.1. Generalidades**

Es un método de propagación de plantas de aplicación profesional, se lo realiza en laboratorio en condiciones estériles e instalaciones especiales. Esto consiste en tomar un trocito de hoja, tallo o embrión de (0.2 a 1mm) o cualquier otra parte de una planta y ponerla a cultivar en un tubo de ensayo sobre un medio acuoso nutritivo.

Lo importante es que se haga en condiciones controladas y estéril: utensilios, cámara de manipulación, etc. todo esto desinfectado en autoclave. Proceso de alto costo debido a que no se puede mecanizar, estos son rentables en laboratorios grandes y con mucho mercado. Las plantas desarrolladas in vitro necesitan una primera aclimatación en el laboratorio; en el invernadero y después una segunda aclimatación en el campo. (<http://universobotanico.blogspot.com/2014/02/cultivo-de-plantas-in-vitro.html>)

#### **3.9.2. Aplicaciones prácticas del cultivo in vitro**

Propagación vegetativa, esto es lo más práctico, dos técnicas.

Micro propagación de estaquillas.

Organogénesis de callos.

Producción de plantas libres de virus mediante dos técnicas:

Cultivo de meristemas.

Micro injerto in vitro.

Permite hacer germinar semillas que son muy difícil de hacer en condiciones normales.

Eliminar la inhibición de germinación de las semillas. El cultivo in vitro es lo más eficaz porque tienen determinados inhibidores y algunos huesos de frutales no son capaces de germinar ya que no tienen desarrollo el embrión.

La palabra auxina en griego significa crecer, se la utiliza para designar a las sustancias de elongación celular. (Martínez, A. *et al* 2007)

### **3.10. Etapas de la propagación in vitro**

#### **3.10.1. Etapa I**

Es la etapa en la cual se establece el cultivo inicial, es una etapa crucial, se selecciona el explantes y se establece un pretratamiento de desinfección, puesto que los explantes obtenidos de plantas adultas pueden estar contaminados con hongos y/o bacterias. El medio utilizado en esta fase generalmente no contiene hormonas. (Krikorian, J. 2011)

#### **3.10.2. Selección del ex plante**

La elección del explante está en función del objetivo que se persigue y la especie utilizada (Roca y Mroginski, 1991b). Según Pierik (1990), la selección del explante puede verse influenciada por:

#### **3.10.3. Genotipo**

La capacidad para regenerarse y de división celular es muy variada dentro de una misma especie. Las dicotiledóneas tienen mayor capacidad de regeneración que las monocotiledóneas. Una planta que se regenera fácilmente in vivo, se espera regenere de igual manera.

La interacción que se produce entre los genes y el ambiente da lugar a diversos efectos fenotípicos. Esta interacción es explotada por los mejoradores, las plantas pueden ser criadas para tener tolerancia a entornos específicos, como alta o baja

disponibilidad de agua. La forma en que los rasgos de expresión varían en toda una gama de entornos para un determinado genotipo se llama norma de reacción. ([https://www.fenotipo.com/interaccion\\_entre\\_genotipo\\_y\\_ambiente.html](https://www.fenotipo.com/interaccion_entre_genotipo_y_ambiente.html))

#### **3.10.4. Edad de la planta**

La capacidad de regeneración de un explante es inversamente proporcional a la edad del cultivo, es por ello que se tiende a utilizar material juvenil, embriones y semillas para regeneración *in vitro*. ([http://extension.illinois.edu/beyond\\_sp/matching.cfm](http://extension.illinois.edu/beyond_sp/matching.cfm).)

#### **3.10.5. Edad del órgano o tejido**

Se prefieren los tejidos jóvenes, no lignificados; a pesar de existir algunas excepciones. Independientemente de la edad, la capacidad regenerativa incrementa durante la floración.

#### **3.10.6. Estado fisiológico**

Se ha demostrado que los explantes en estado vegetativo tienen mayor capacidad de regeneración *in vitro*, que los explantes en estado generativo. Las yemas en estado de reposo presentan mayor dificultad para regenerar. El potencial organogénico del explante es inverso a su edad fisiológica. (Roca, W. 2013)

#### **3.10.7. Estado sanitario**

Es importante seleccionar explantes sanos, pues esto repercute en el éxito del cultivo y en la contaminación del mismo. Se considera una planta sana a aquella que es capaz de realizar todas sus funciones al máximo de su capacidad genética. Luego, cualquier factor que interfiera en su normal desarrollo será un agente incitante de enfermedad en la planta que se expresará por cambios de mayor o menor notoriedad (síntomas) en apariencia y funciones y, eventualmente, efectos que disminuyen el valor económico del cultivo al reducir la calidad y cantidad del producto obtenido. (<https://sabiduriaenlahistoria.wordpress.com/2016/05/19/estado-sanitario-de-las-plantas/>)

### **3.10.8. Topófisis**

Se refiere a la ubicación del explante dentro de la planta, se recomienda el uso de vástagos más cercanos a la base del tallo y meristemas apicales.

### **3.10.9. Tamaño del ex plante**

Mientras mayor es el tamaño del explante es más fácil su regeneración, puesto que tienen sus propias reservas y hormonas. Los explantes pequeños son más fáciles de desinfectar, pero su viabilidad tiende a ser baja además se dañan fácilmente. (Roca, W. 2013)

### **3.10.10. Protocolo de desinfección**

El principal objetivo es evitar la contaminación en el cultivo de tejidos, para el éxito de éste. Este proceso debe permitir eliminar los microorganismos con el menor daño posible, mediante la desinfección superficial. No existe un protocolo general para la desinfección, pero para esto se debe tener en cuenta la especie y el tipo de explante. (Luther, M. 2017)

## **3.11. Etapa II**

Esta es la fase de multiplicación simplemente o multiplicación de brotes y callos. En esta etapa se emplean medios con reguladores de crecimiento: como las citocininas y auxinas.

La fase de elongación se ve incluida en esta etapa (elongación de brotes), es de gran importancia puesto que prepara a las yemas para el enraizamiento, su duración es de 10-15 días, su medio tiene alto contenido de citocininas. (<https://tecnoagro.com.mx/revista/2018/no-124/etapas-de-micropropagacion.html>)

## **3.12. Etapa III**

Es la fase de enraizamiento o de pretransplante, es la fase en la que se pretende que la planta sea autotrófica, para que sea capaz de adaptarse al medio externo (Murashige, 1974 citado en Krikorian, 1991b). Para la fase de enraizamiento se

requiere un medio adicionado con auxinas, Ácido naftalen acético (ANA) y Ácido indol butírico (AIB) son más efectivos en rizogénesis que Ácido indol acético (AIA), además requiere una fuente de carbohidratos, como lo es la sacarosa. (Cleand, E. 2015)

### **3.13. Etapa IV**

Es la etapa de adaptación de la vitroplanta al medio externo o la fase de transferencia final. Esta fase es importante, ya que una planta regenerada *in vitro*, difiere en varios aspectos de una planta originada in vivo, por lo tanto, su adaptación al medio externo es complicada. La vitroplanta debido a la alta humedad relativa (90-100%), posee una cutícula poco desarrollada y su sistema de cierre de estomas está atrofiado. Además, no realizan un proceso de fotosíntesis normal, ya que su fuente de carbono está dispuesta en el medio, tienen hojas delgadas y con menor contenido de clorofila; por lo tanto, es necesario activar paulatinamente su autótrofa para su adaptación al medio externo. El mecanismo de defensa de estas plantas no está activado, ya que se desarrollan en un medio estéril, por lo que resulta importante trabajar en condiciones asépticas, para obtener una alta tasa de sobrevivencia al cambiar las plantas *in vitro* al suelo. (Patiet, C. 2004)

### **3.14. Factores limitantes**

#### **3.14.1. Fenolización**

Durante el cultivo *in vitro*, algunas plantas al sufrir heridas producen exudados de color marrón o negro, como producto de la liberación y oxidación de polifenoles y taninos, que resultan en compuestos quinónicos que son tóxicos y, frecuentemente afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas, pudiendo ocasionar la muerte del explante. (Toro, B. 2004)

La fenolización u oxidación, es el pardeamiento de los tejidos, más común en especies leñosas, se debe a diversos factores como: luz, especie, concentración de amonio en el medio, entre otros. Entre los controles de la oxidación, se encuentran los subcultivos y eliminación de tejidos senescentes de la base de los brotes (Angarita y Perea, 1991), la adicción al medio de carbono activado (0,2-0,3%), PVP

(250-1000 ppm), antioxidantes (ácido cítrico, ácido ascórbico, tiourea o L-cistina), dietil-tiocarbamato ( $2\text{g.L}^{-1}$ ) o aminoácidos (glutamina, arginina y asparagina); también es útil el uso de medios líquidos, el mantener los vástagos en la oscuridad, la reducción del tejido herido, el reducir la concentración de sales y el uso de reguladores, y lavar los explantes antes introducir. (Ancora, G. *et al* 2004)

### **3.14.2. Contaminación**

Existen cuatro fuentes de contaminación: el explante, el medio, el aire y el operador; la más importante es el material vegetal. La contaminación puede presentarse por un inadecuado protocolo de desinfección, cuando es una contaminación exógena y, al ser una contaminación endógena cuando se trata de contaminantes sistémicos. (Toro, B. 2004)

## **3.15. Requerimientos para un laboratorio**

### **3.15.1. Área de preparación**

Se utiliza principalmente para preparar los medios de cultivo, pero debe proveer también un espacio para almacenar los materiales de vidrio y de plástico, y los reactivos químicos, este ambiente debe contar con mesas de trabajo para la preparación de los medios. El área de lavado debe incluir por lo menos un lavadero grande con agua caliente y agua fría y una fuente de agua de alto grado de pureza, preferiblemente agua doblemente destilada. (Roca, W. 2013)

### **3.15.2. Área de transferencia**

En esta área del laboratorio se realiza el trabajo de excisión, inoculación y transferencia de los explantes a los medios de cultivo. Dado que este trabajo demanda los más altos niveles de limpieza ambiental, se recomienda la instalación de gabinetes de flujo horizontal o vertical de aire filtrado o bajo presión, o la construcción de cuartos de transferencia. (Malojovich, M. 2017).

### **3.15.3. Área de incubación**

Los cultivos se incuban en un cuarto apropiado o en gabinetes o cámaras de crecimiento; éstas pueden ser más eficientes en cuanto al control ambiental, pero son más costosas. El área de incubación o crecimiento in vitro debe proporcionar un buen control de la temperatura (20–28°C), la iluminación (variable, según las necesidades: 1000 a 5000 lux) y la humedad relativa (70% - 80%). (Roca, W. 2013)

### **3.15.4. Área de crecimiento**

Las plantas que se regeneran en el área de incubación se pueden acondicionar o aclimatar y luego trasplantar en macetas, bandejas o camas apropiadas. Estas operaciones se pueden llevar a cabo en tinglados, casas de malla o invernaderos, dependiendo las condiciones climáticas del lugar donde está ubicado el laboratorio y de los requerimientos de aislamiento de los materiales por razones fitosanitarias. (Ledin, B. 2005)

### **3.15.5. Área de cuarentena y de control fitosanitario**

Cuando la función del laboratorio es la producción de materiales elites de sanidad certificada, se hace necesario contar con un área para la recepción de las muestras o plantas destinadas a la limpieza clonal, generalmente protegida contra insectos. Esta área de cuarentena debe estar separada del resto del laboratorio, pero cercana al área de control fitosanitario. (Monteiro, M. 2004)

## IV. MARCO METODOLÓGICO

### 4.1. Materiales

#### 4.1.1. Localización de la investigación

Provincia	Bolívar
Cantón	Guaranda
Parroquia	Veintimilla
Sitio	Laguacoto II

#### 4.1.2. Situación climática y geográfica

Localidad	Laguacoto II
Altitud	2622 msnm
Latitud	01° 36' 88'' S
Longitud	78° 59' 88'' W
Temperatura media anual	14,5°C
Temperatura máxima	23°C
Temperatura mínima	2°C
Precipitación media anual	880 mm
Heliofanía	850(h/l) año
Humedad relativa	70%

(Fuente: Monar, C. 2017 y Estación Meteorológica Laguacoto II)

#### 4.1.3. Zona de vida

La localidad en estudio de acuerdo a las zonas de vida de HOLDRIGE, L, corresponden al bosque seco montano bajo (bs – MB).

#### 4.1.4. Material experimental

Se utilizó explantes de brotes apicales de mora y dos citiquininas. tres dosis de reguladores de crecimiento.

#### 4.1.5. Equipos del laboratorio

- Cámara de flujo laminar
- Balanza analítica

- Autoclave vertical
- Ph metro
- Horno de microondas
- Agitador magnético
- Microondas
- Destilador de agua
- Refrigerador
- Pinzas
- Mecheros
- Erlenmeyer

#### **4.1.6. Materiales de campo**

- Machete
- Tijera de podar
- Navaja
- Papel periódico
- Balde de 20 litros
- Agua
- Fundas plásticas

#### **4.1.7. Materiales del laboratorio**

- Reactivos.
- Vasos de precipitación de 1000, 500, 250, 100 ml.
- Erlenmeyer de 1000, 500, 250, 100 ml.
- Probetas aforadas de 500, 250, 100, 25 ml.
- Cajas Petri de vidrio
- Tubos de ensayo
- Frascos de vidrio de 250 ml
- Pissetas
- Mecheros de alcohol
- Espátulas
- Pinzas de disección

- Bisturís
- Mangos para bisturí N.- 4
- Hojas de bisturí N.- 20
- Magentas autoclabe
- Papel aluminio

#### **4.1.8. Materiales de oficina**

- Calculadora
- Computadora con sus respectivos accesorios
- Lápices
- Flash memory
- Papel boom
- Regla
- Teléfono celular
- Tablero de datos

#### **4.1.9. Desinfectantes**

- Hipoclorito de sodio
- Alcohol antiséptico
- Alcohol Industrial

#### **4.2. Métodos**

Factores en estudio

**Factor A:** Citoquininas

A1=Bencyl adenina

A2=Kinetina

**Factor B:** Dosis

B1=1 mg

B2=3 mg

B3=5 mg

#### 4.2.1. Tratamientos

Combinación de factores A x B según el siguiente detalle.

Tratamientos	Código	Detalle
T1	A1B1	Bencyl adenina 1 mg
T2	A1B2	Bencyl adenina 3 mg
T3	A1B3	Bencyl adenina 5 mg
T4	A2B1	Kinetina 1 mg
T5	A2B2	Kinetina 3 mg
T6	A2B3	Kinetina 5 mg

#### 4.3. Tipo de diseño experimental

DCA Diseño completamente al azar en arreglo factorial 2 x 3

##### 4.3.1. Procedimiento

Localidad	1
Número de tratamientos	6
Número de repeticiones	4
Número de unidades experimentales	24
Número de explantes	96

##### 4.3.2. Tipos de análisis

- Análisis de Varianza (ADEVA) según el siguiente detalle

Fuente de Variación	Grados de Libertad	CME
TOTAL (t x r)-1	23	$\frac{1}{2}e + 6 \frac{1}{2}$ Repeticiones
REPETICIONES (r -1)	3	$\frac{1}{2}e + 6 0^2A$
FACTOR A (a-1)	1	$\frac{1}{2}e + 6 0^2B$
FACTOR B (b-1)	2	$\frac{1}{2}e + 2 0^2A*B$
A x B (a-1)(b-1)	2	$\frac{1}{2}e$
ERROR (t-1)(r-1)	5	

Cuadrados Medios Esperados. Modelo fijo. Tratamientos seleccionados por el investigador.

- Prueba de Tukey al 5% para comparar promedios de tratamiento y Factor B
- Análisis de efecto principal para Factor A.
- Análisis de correlación y regresión simple

#### **4.4. Métodos de evaluación y datos tomados**

##### **4.4.1. Número de explantes contaminados (NEC)**

Variable que fue registrada a los 15 días de haber sido introducidos los brotes a los tubos de ensayo que contenían el medio de cultivo, la misma que se registró de forma visible contabilizando el número de contaminación existente en cada tratamiento y repetición.

##### **4.4.2. Días a transferir a un medio de multiplicación (DTMM)**

Dato que fue registrado contando los días transcurridos, desde el momento que se colocó los explantes en el medio de cultivo hasta cuando esta que tuviera aproximadamente 3 centímetros de longitud.

##### **4.4.3. Número de brotes por explante (NBE)**

Se registró esta variable contabilizando los brotes de cada explante de forma visual para cada tratamiento y repetición a los 30, 60 y 90 días

##### **4.4.4. Longitud de los brotes (LB)**

La longitud de los brotes se tomó a 10 frascos al azar en cada tratamiento y repetición, desde la base del tallo hasta el ápice de los brotes, medidas por la parte exterior del frasco con la ayuda de una regla, resultado que fue expresado en cm a los 30, 60 y 90 días.

##### **4.4.5. Número de hojas por brote (NHB)**

Para evaluar esta variable se procedió a contar de forma directa el número total de hoja en 10 frascos al azar para cada tratamiento y repetición, a los 30, 60 y 90 días.

##### **4.4.6. Días a la emisión de raíces (DER)**

Se determinó esta variable contando los días transcurridos desde la aparición de las primeras raicillas de los brotes en más del 50%, esto se efectuó por conteo directo.

#### **4.4.7. Longitud de la raíz (LR)**

Variable que se registró a los 90 días, con la ayuda de una regla en dos frascos tomadas al azar de cada tratamiento y repetición, esto se realizó desde el cuello de a raíz hasta la cofia de la raíz principal, su resultado se expresó en cm.

#### **4.4.8. Volumen de la raíz (VR)**

Esto se realizó en 2 frascos tomadas al azar en cada tratamiento y repetición a los 90 días, la misma que se efectuó con la ayuda de una probeta aforada con un determinado nivel de agua, sumergiendo los brotes y de esta manera obtuvimos el volumen de raíz dando un resultado en cc.

### **4.5. MANEJO DEL EXPERIMENTO**

#### **4.5.1. Selección de la planta**

En la sección de planta para la extracción de brotes se seleccionó plantas con menor área afectada de plagas y enfermedades, en esta selección observamos las plantas genéticamente óptimas como es el vigor de la planta, y tamaño y formación del fruto. Esto se realizó en 20 planta de las cuales se extrajo de 3 a 5 ramas, mismas que se protegieron con papel húmedo hasta ser llevadas al laboratorio.

#### **4.5.2. Recolección de brotes en el campo**

La recolección de brotes se realizó seleccionando las mejores plantas con características favorables de manejo cultural y fitosanitario, se extrajo las mejores ramas juveniles y en crecimiento activo de 20 a 30 cm de longitud, el material vegetativo fue tomado de Naguan en la Universidad Estatal de Bolívar, considerando que son plantas en estudio y con cuidados activos.

#### **4.5.3. Evitar deshidratación del material vegetativo**

Luego de la recolección en el campo del explante procedimos a ejecutar una debida protección ya que es un material vegetativo muy delicado cubriéndolo con papel periódico humedecido para evitar deshidratación y muerte del explante. Esto se

realizó con el fin de cuidar y no tener ningún tipo de pérdida para la debida ejecución del experimento en estudio.

#### 4.5.4. Desinfección del material en el laboratorio

Par la desinfección de los brotes se procedió a lavarlos con agua destilada y jabón líquido al 5% durante 20 minutos, luego realizamos enjuagues consecutivos para eliminar los residuos de jabón. Posteriormente en la cámara de flujo laminar desinfectamos los brotes en etanol al 50% durante 2 minutos, de igual manera se usó hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.5% durante 10 minutos, finalmente se eliminaron los restos del desinfectante con agua destilada esterilizada, luego de este proceso de desinfección se colocaron los explantes en tubos de ensayo que contenían el medio de cultivo previamente preparado.

#### 4.5.5. Selección del medio a utilizar

Se utilizó el medio de cultivo según Murashige y Skoog, en el que se añadió, macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, agar y reguladores de crecimiento (bencil- adenina) y Kinetina en tres concentraciones 1,0 mg/l, 3,0mg/l y 5,0mg/l. respectivamente con un pH de 5.6.

Constituyente	Concentración de la solución madre (g/L)	Volumen de la solución madre por litro de medio
<b>Macronutrientes</b>		100 ml
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16,5	
KNO <sub>3</sub>	19	
CaCl <sub>2</sub>	4,4	
MgSO <sub>4</sub>	3,7	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,7	
<b>Micronutrientes</b>		10 ml
MnSO <sub>4</sub>	1,69	
ZnSO <sub>4</sub> .	0,86	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,62	
KI	0.083	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.025	
<b>Fuente de hierro</b>		10 ml
FeSO <sub>4</sub>	0.00556	
Na <sub>2</sub> EDTA	0.00746	
<b>Vitaminas</b>		

Myo Inosito	10	10 ml
Nicotínico	0,05	
Piridoxina	0,05	
Glicina	0,2	
Tiamina	0,01	

Se adiciono al medio 3% de azúcar y 0.8% de agar

Para su preparación se realizó el siguiente procedimiento:

- Se colocó en un vaso de precipitación agua destilada en una tercera parte del volumen final a prepararse.
- Procedimos a pesar 30gr de azúcar, 7gr de agar y otros componentes en estado sólido. El azúcar se añadió en ese momento, mientras que el agar se colocó cuando el medio contenía aproximadamente 80 °C.
- Se colocaron las soluciones de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y reguladores de crecimiento (citocininas) previamente preparadas en tres concentraciones 1, 2 y 3 mg/ltr. de cada solución, esto se realizó de manera exacta.

Soluciones Concentradas	Cc/ltr
STOCK N.-1	100
S STOCK N.-2	10
S STOCK N.-3	10
VITAMINAS	10

- Pesamos y medimos los reguladores de crecimiento que se utilizó, de la misma manera diluimos adecuadamente según el tipo. Ya disuelto se añadió a la solución.
- Aforamos en una probeta de 500 ml. con agua destilada hasta completar el volumen total.
- Se midió el pH de la solución y se ajustó a 5.6
- En el horno de microondas se calentó el medio preparado luego se añadió el agar.
- Se realizó un proceso de dispensación en los frascos de vidrio, 60 cc. aproximadamente por cada uno.
- Procedimos a esterilizar el medio preparado en la autoclave a 121°C durante 20 minutos.

- Seguido de esto sacamos de la autoclave los frascos en una bandeja metálica y dejamos enfriar en el área de transferencia.

#### **4.5.6. Introducción del material *in vitro***

Luego de la desinfección superficial, de los explantes de mora, se colocó en el medio de cultivo estéril. En un lapso de 8 a 15 días, comenzó el proceso de brotación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro*.

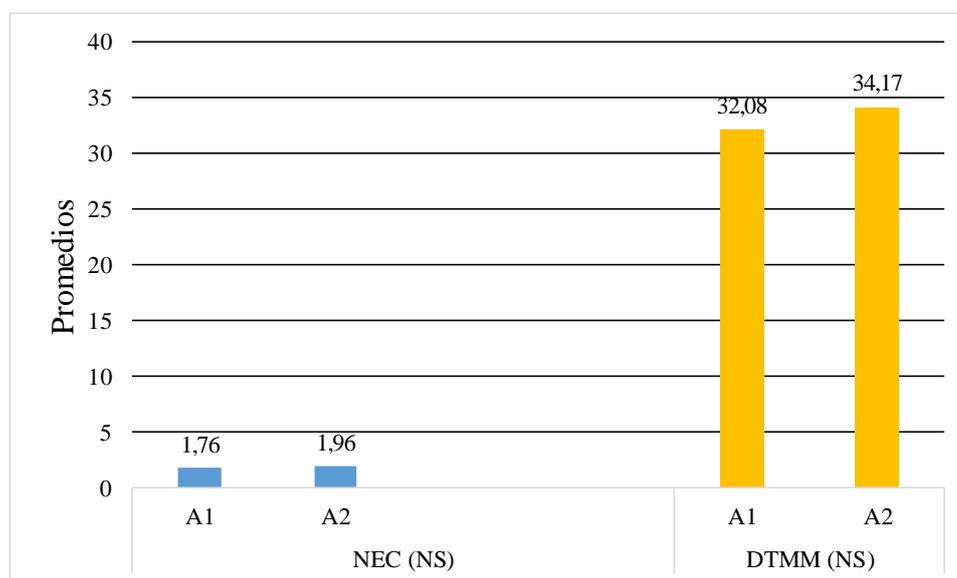
## V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 5.1. Variables Agronómicas. Número de explantes contaminados (NEC) a los 90 días y Días a la transferencia a medios de multiplicación. (DTMM) a los 30 días.

**Cuadro N° 1.** Resultado del análisis del efecto principal para evaluar promedios del Factor A: variables. Numero de Explantes contaminados (NEC) evaluado a los 90 días y Días a la trasferencia de medios de multiplicación (DTMM) a los 30 días.

NEC a los 90 días (NS)		DTMM a los 30 días (NS)	
Factor A: Citoquininas	Promedios	Factor A: Citoquininas	Promedios
A1: Bencyn adenina	1.76	A1: Bencyn adenina	32.08
A2: Kinetina	1.96	A2: Kinetina	34.17
<b>Efecto principal: A2- A1= 0.16</b>		<b>Efecto principal: A2- A1= 2.09</b>	

**Gráfico N° 1.** Tipos de hormonas en las variables Número de explantes contaminados y Días a la transferencia medios de multiplicación.



## **FACTOR A: Citoquininas**

Con el análisis del efecto principal factor A, en las hormonas Bencyl adenina (A1) y Kinetina (A2), para las variables Número de explantes contaminados evaluada a los 90 días sobresale la hormona Kinetina (A2) con un porcentaje de 1.96 y con un valor inferior Bencyl adenian con 1.76 respectivamente, siendo estos no significativos (NS). (Cuadro N° 1 y Gráfico N° 1)

Los explantes contaminados van a depender siempre de los cuidados sanitarios en los que estarán expuestos cabe recalcar que también depende de la variedad de la planta madre que es extraída.

En cuanto a la variable Días a la transferencia a medios de multiplicación la hormona A2 es la que presento el mayor número de días para ser transferida a medios de multiplicación con un total de 34 días, a diferencia de la hormona (A1) que presento un promedio de 32 días para ser transferido a los medios de multiplicación, dando como resultado un total de 2 días de diferencia en cuanto a esta variable, siendo esto estadísticamente no significativo (NS). (Cuadro N° 1 y Gráfico N° 1)

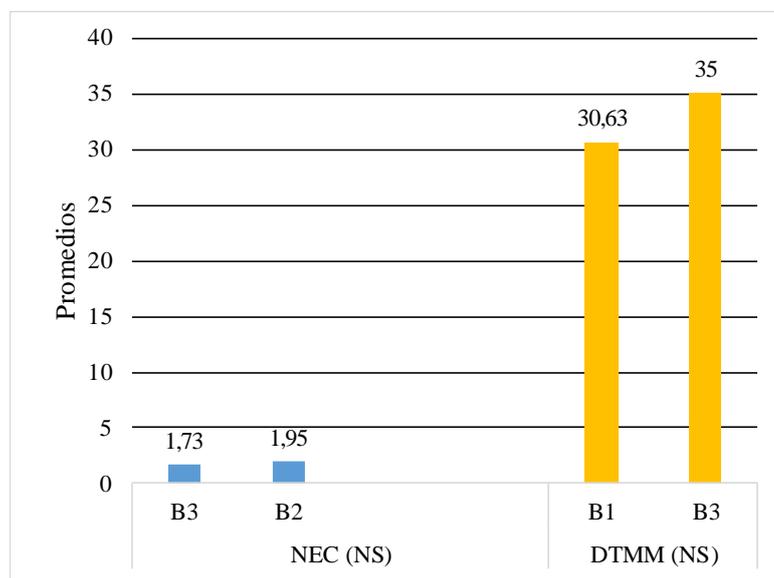
Podemos indicar que no existe un mayor promedio de diferencia ya que son transferidas al momento que se observa que ya necesitan del medio de cultivo donde se desarrollan con la aplicación respectiva de las hormonas de crecimiento y dosificaciones según sus tratamientos, esto no provoca alteraciones físicas o fisiológicas para cada uno de los explantes.

**FACTOR B: Dosis**

**Cuadro N° 2.** Resultados de la prueba de Tukey al 5% para comparar promedios de tratamiento Factor B de las variables Número de explantes contaminados (NEC) y Días a la transferencia a medios de multiplicación.

NEC a los 90 días (NS)			DTMM a los 30 días (NS)		
Factor B: Dosis	Promedio	Rango	Factor B: Dosis	Promedio	Rango
B1.= 1 mg	1.84	A	B1.= 1 mg	30.65	A
B2.= 3 mg	1.95	A	B2.= 3 mg	33.75	A
B3.= 5 mg	1.73	A	B3.= 5 mg	35.00	A

**Gráfico N° 2.** Promedio de la variable Número de explantes contaminados (NEC) a los 90 días y Días a la transferencia de medios de multiplicación a los 30 días en el cantón Guaranda, 2018.



En cuanto a la variable número de explantes contaminados (NEC) evaluada a los 90 días se encontró el valor más alto para el Factor B2 con 1.95 mg de dosis para los explantes. De la misma manera se evaluó el Factor B3 siendo este el que

presento el rendimiento más bajo en dosificación para esta variable con 1.73 mg. Siendo estas no significativas respectivamente (Cuadro N° 2 y Gráfico N° 2)

En la variable días a la transferencia de medios de multiplicación la dosis para los explantes en el Factor B3, siendo esta una dosis de 5 mg teniendo un resultado de 35 días de la transferencia, en cuanto al Factor B1 presento un promedio de 30 días, siendo esta variable no significativa. (Cuadro N° 2 y Grafico N° 2)

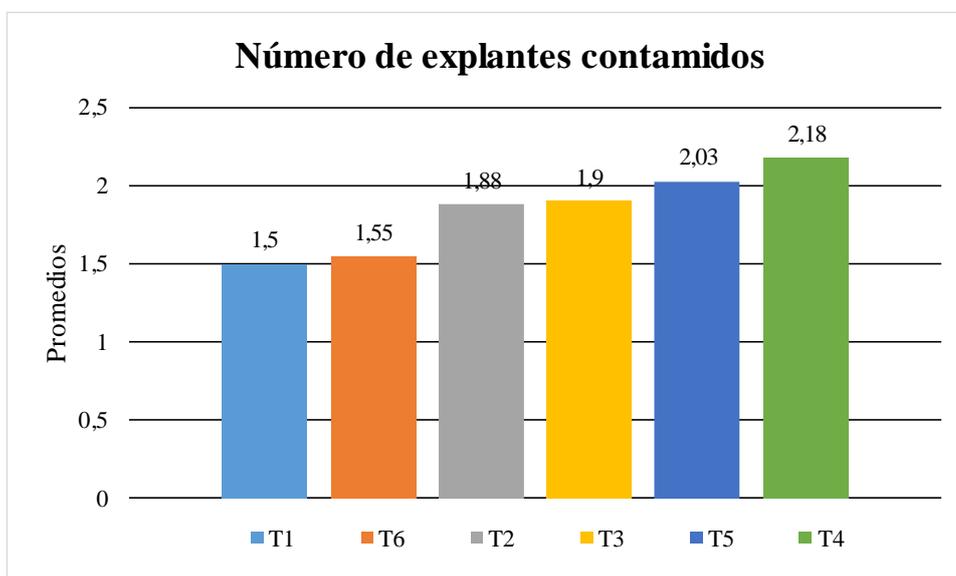
Las variables número de explantes contaminados y días a la transferencia de medios de multiplicación dependieron del medio de cultivo en el que se desarrolló, debido a su alto número de nutrientes y a los cuidados para evitar todo tipo de contaminación.

### **TRATAMIENTOS (AxB)**

**Cuadro N° 3.** Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de tratamiento (AXB) en las variables número de explantes contaminados y días a la transferencia de medios de multiplicación

<b>NEC a los 90 días (NS)</b>			<b>DTMM a los 30 días (NS)</b>		
<b>Trat #</b>	<b>Promedio</b>	<b>Rango</b>	<b>Trat #</b>	<b>Promedios</b>	<b>Rango</b>
T1	1.50	A	T1	28.75	A
T6	1.55	A	T4	32.50	A
T2	1.88	A	T2	33.75	A
T3	1.90	A	T3	33.75	A
T5	2.03	A	T5	33.75	A
T4	2.18	A	T6	36.25	A
<b>CV= 28.6 %</b>			<b>CV= 22.3 %</b>		

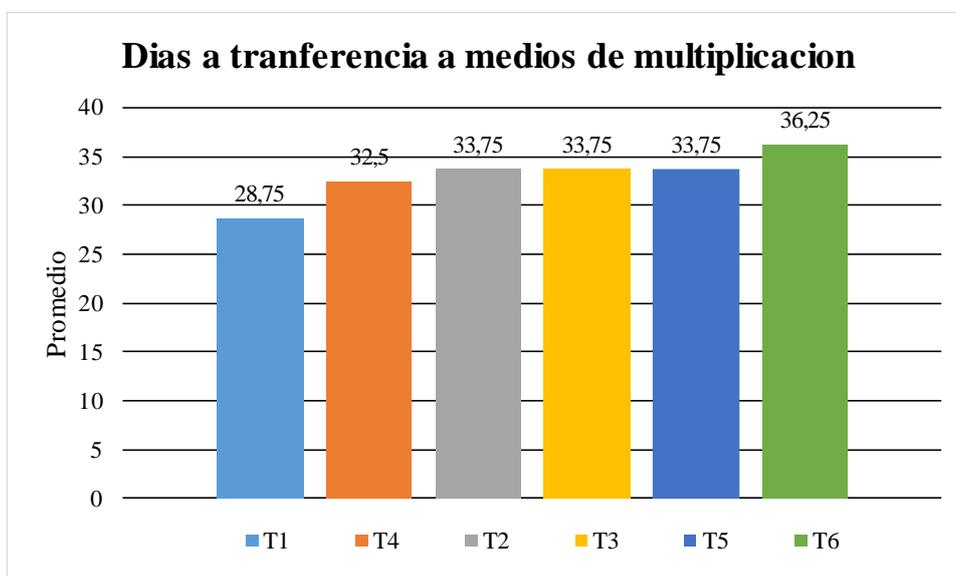
**Grafico N° 3.** Promedio de tratamientos AXB de la variable Número de explantes contaminado (NEC) a los 90 días.



La respuesta a la variable Número de explantes contaminados(NEC) evaluado a los 90 días presento una media general de 1,84 con un CV de 28,6%. Donde el tratamiento que presento mayor contaminación fue el T4 2.8 (Kinetina 1mg), existió la presencia de frascos contaminados los mismos que presentaron mortandad a los 60 días de estar en estudio. El tratamiento que obtuvo menor contaminación es el T1 (Bencina adenina 1 mg) con un promedio de 1,50. Cabe indicar que presento una significancia estadística (NS) en cuanto a esta variable respectivamente. (Cuadro N° 3 y Gráfico N° 3)

El número de plantas que se obtiene depende de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo, la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados.

**Gráfico N° 4.** Promedio de la variable Días a la transferencia a medios de multiplicación (DTMM), en el cantón Guaranda, 2018.



La media general de la variable Días a la transferencia a medios de multiplicación (DTMM) fue de 33 días con un coeficiente de variación de 22,3%. El tratamiento que presento el mayor tiempo en ser transferido fue el T6 con 36 días lo que indica que en el lapso de ese tiempo no existía mayor desarrollo de los explantes, el T1 fue el transferido en corto tiempo con un total de 28 días, cabe recalcar que existe una diferencia de 8 días entre estos dos tratamientos, presentando una estadística no significativa. (Cuadro N° 3 y Gráfico N° 4)

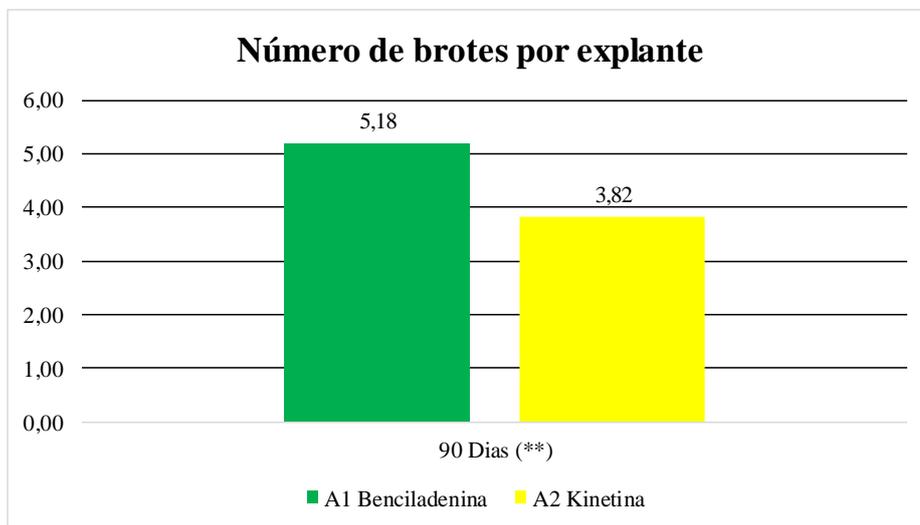
En buenas condiciones los explantes son transferidos a los medios de multiplicación de 25 a 30 días dependiendo del desarrollo de cada uno de estos el T6 (Kinetina 5mg) al momento de ser transferido es el que toma un periodo de transferencia más alargado que el resto de tratamiento debido a los estimulantes o dosis en estudio, no son suficientemente autosuficientes es decir aun dependen del aporte de exógeno y de azúcares del medio en el que se desarrolló. (Cuadro N° 3 y Gráfico N° 4)

**Cuadro N° 4.** Análisis de efecto para comparar promedios de Factor A dosis en las variables Número de brotes por explante (**NBE**) a los 60 y 90 días, longitud del brote (**LB**), a los 30, 60 y 90 días y la variable Numero de hojas del brote (**NHB**), a los 30, 60 y 90 días.

<b>NBE (**)</b>		<b>LB (*)</b>		<b>NHB (**)</b>	
Factor A: Citoquininas	90dias	Factor A: Citoquininas	90dias	Factor A: Citoquininas	90dias
A1: Bencyn adenina	5.18	A1: Bencyn adenina	2.01	A1: Bencyn adenina	10.14
A2: Kinetina	3.82	A2: Kinetina	1.72	A2: Kinetina	8.59
<b>Efecto principal: A2- A1= 1.52</b>		<b>Efecto principal: A2- A1= 0.29</b>		<b>Efecto principal: A2- A1= 1.55</b>	

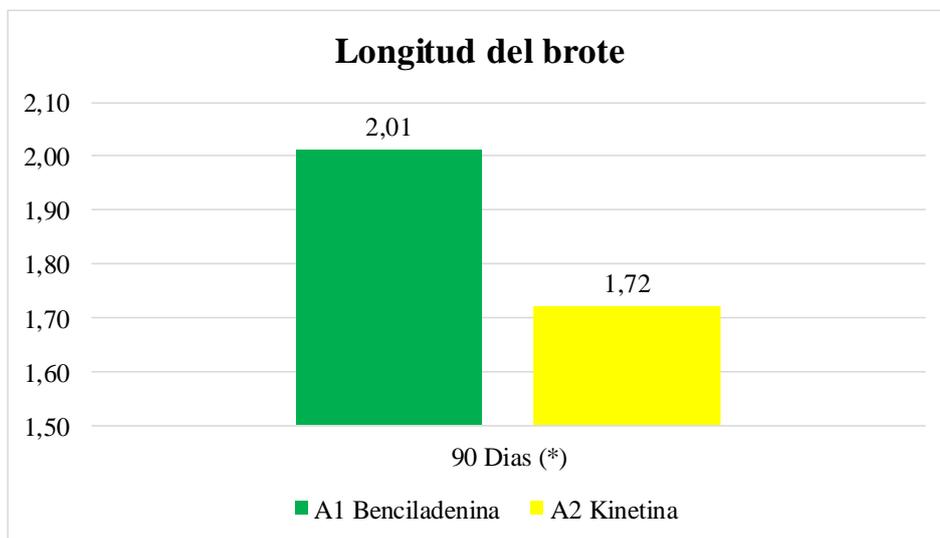
## FACTOR A: Citoquininas

**Grafico N° 5.** Resultado de promedios del Factor A Citoquinas en la variable Número de brotes por explante (NBE) a los 90 días, en el cantón Guaranda, 2018.



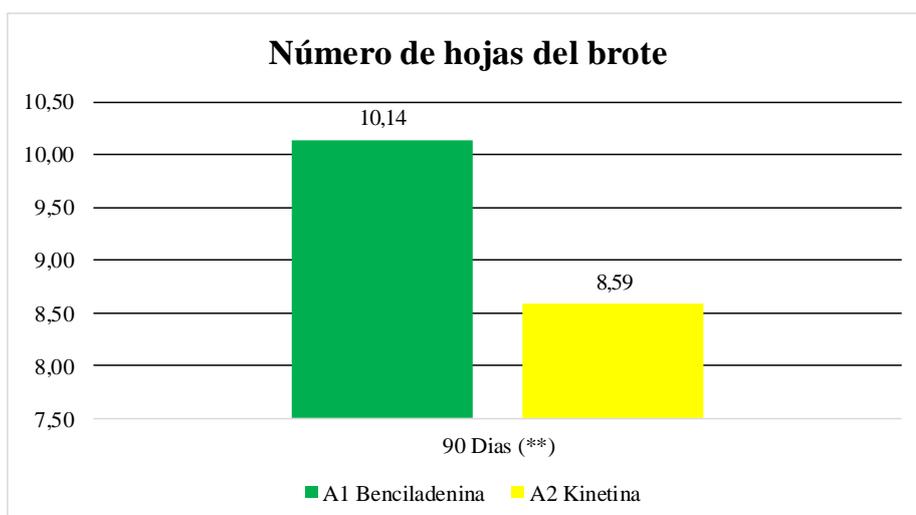
Con el análisis del efecto principal del factor A, la variable Número de brotes por explante (NBE), la hormona que sobresale es la A1 (Bencilanina) 5,18% a diferencia de la A2 (Kinetina), lo que indica que la hormona A1 ayuda al desarrollo de explantes de mora de castilla. A los 90 días se registró una significancia (\*\*\*) (Cuadro N° 4 y Gráfico N° 5).

**Grafico N° 6.** Resultado de promedios del Factor A Citoquinas en la variable Longitud del brote (LB) a los 90 días, en el cantón Guaranda, 2018.



De acuerdo con lo realizado el efecto principal del factor A de la variable Longitud del Brote (LB) a los 90 días fue (\*\*), la hormona que influyo mayormente es la A1 Bencilanina y con menor influencia la Kinetina, se registra una diferencia de 0.29 cm más en la longitud del brote. (Cuadro N° 4 y Gráfico N° 6).

**Grafico N° 7.** Resultado de promedios del Factor A Citoquinas en la variable Número de hojas del explante (NHE) a los 90 días, en el cantón Guaranda, 2018.



Para el Número de hojas del explante (NHE) a los 90 días fue (\*\*), siendo la hormona que sobresale es la A1 Benciladenina es la responsable del mayor número de hojas para esta variable con un total de 10 hojas, a relación de la A2 Kinetina, dándonos una diferencia de una hoja a los 90 días. (Cuadro N° 4 y Gráfico N° 7).

La respuesta en cuanto a las variables Número de brotes por explante, Longitud del Brote, Número de hojas del explante, son variables que depende la una de la otra ya que todas se forman y desarrollan por las hormonas que fueron requeridas en esta investigación, el alto contenido de nutrientes y la dosificación establecida son las que complementan su óptimo desarrollo.

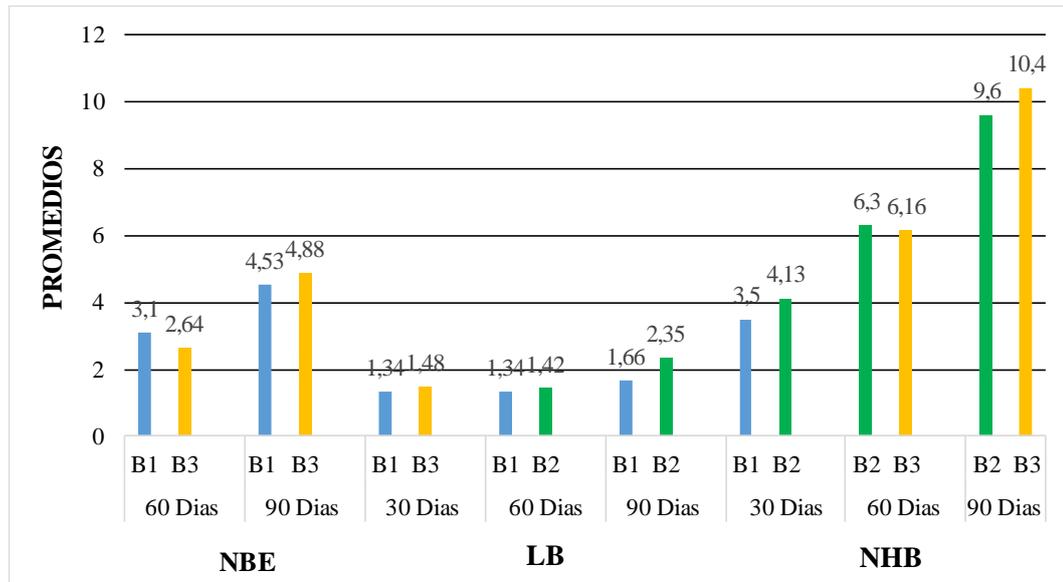
Cada una de estas variables a nivel de laboratorio dependen del desarrollo y condiciones en las que se formaron, el alto contenidos de micro y macro nutrientes favorecen el desarrollo en cada una de las variables en estudio, a mayor longitud del brote obtendremos mayor número de hojas lo que indica que esto es una respuesta lógica.

**Cuadro N° 5.** Resultado de la prueba de Tukey al 5% para evaluar promedios del Factor B: En las variables Número de Brotes por Explantes (NEE), Longitud del Brote (LB) Número de hojas del brote (NHB), a los 30, 60 y 90 días.

<b>NBE</b>				<b>LB</b>				<b>NHB</b>			
<b>Factor: B Dosis</b>	<b>30 días</b>	<b>60 días (NS)</b>	<b>90 días (**)</b>	<b>Factor: B Dosis</b>	<b>30 días(NS)</b>	<b>60 días (NS)</b>	<b>90 días (**)</b>	<b>Factor: B Dosis</b>	<b>30 días (NS)</b>	<b>60 días (NS)</b>	<b>90 días (**)</b>
B1: 1mg	0	3.10 A	4.53 A	B1: 1mg	1.34 A	1.34 A	1.66 B	B1: 1mg	3.50 A	5.94 A	8.10 C
B2: 3mg	0	2.21 A	4.10 B	B2: 3mg	1.23 A	1.42 A	2.35 A	B2: 3mg	4.13 A	6.30 A	9.60 B
B3: 5mg	0	2.64 A	4.88 A	B3: 5mg	1.48 A )	1.31 A	1.58 B	B3: 5mg	3.36 A	6.16 A	10.40 A

## FACTOR B: Dosis

**Gráfico N°8.** Promedio de las variables evaluadas del Factor B, Numero de hojas del brote, Longitud del brote, Numero de hojas del brote, en el cantón Guaranda, 2018.



Con la prueba de Tukey al 5% se logra observar que en la variable número de brotes por explante a los 60 días sobresale el B1(1mg) con un promedio de 3.10mg y a los 90 días el B3 (5mg) con un promedio de 4.88mg (Cuadro N°5 y Gráfico N°8)

Para las variables longitud del brote y número de hojas del brote, se tomó en cuenta los resultados obtenidos a los 90 días, para LB con un porcentaje 2.35 mg (B2) y en NHB presento un porcentaje de 10.40mg (B3) siendo estos los porcentajes más altos que influyeron en la dosificación para el desarrollo y formación de los brotes en los frascos en estudio. (Cuadro N°5 y Gráfico N°8)

La dosificación de hormonas que se estableció para cada variable ayudo al desarrollo y formación de cada una de las variables en estudio. Dando como resultado los diferentes promedios de crecimiento a los 30, 60 y 90 días, pudiendo indicar que cada una de estas variables se adaptaron a cada una de las dosis establecidas.

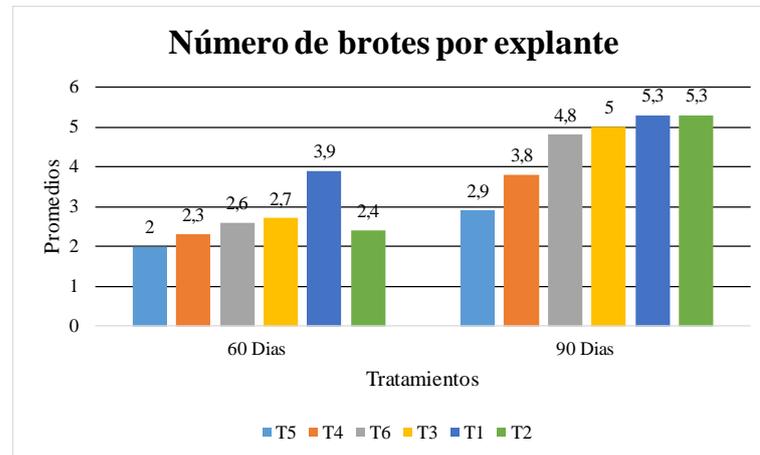
El buen cuidado en condiciones asépticas ayuda al crecimiento de cada uno de los explantes dando como resultado mayor número de explantes, longitud del brote y por ende formación de hojas normalmente.

**Cuadro N° 6.** Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de tratamiento (AXB) en las variables Número de brotes por explante (NBE), Longitud del brote (LB), Número de hojas del brote (NHB), a los 30, 60 y 90 días.

NBE					LB						NHB (**)					
60 Días (NS)			90 Días (**)		30 Días (NS)		60 Días (NS)		90 Días (**)		30 Días (NS)		60 Días (NS)		90 Días (**)	
Trat	Prom	Rag	Prom	Rag	Prom	Rag	Prom	Rag	Prom	Rang	Prom	Rang	Prom	Rang	Prom	Rang
<b>T1</b>	3.93	A	5.28	A	1.20	A	1.35	A	1.82	B	3.45	A	6.30	AB	8.68	B
<b>T2</b>	2.39	A	5.30	A	1.15	A	1.53	A	2.85	A	4.10	A	6.92	A	11.00	A
<b>T3</b>	2.70	A	4.98	A	1.19	A	1.20	A	1.35	B	3.88	A	6.94	A	10.75	A
<b>T4</b>	2.28	A	3.78	B	1.48	A	1.33	A	1.50	B	3.55	A	5.59	AB	7.53	B
<b>T5</b>	2.04	A	2.90	C	1.32	A	1.31	A	1.85	B	4.15	A	5.68	AB	8.20	B
<b>T6</b>	2.58	A	4.78	A	1.77	A	1.42	A	1.81	B	2.85	A	5.38	B	10.05	A
<b>CV= 43.5 %</b>			<b>CV= 7.2 %</b>		<b>CV= 26.8%</b>		<b>CV=20.2 %</b>		<b>CV=14.2%</b>		<b>CV= 6.2 %</b>		<b>CV= 9.8%</b>		<b>CV= 6.2%</b>	

## TRATAMIENTOS (AxB)

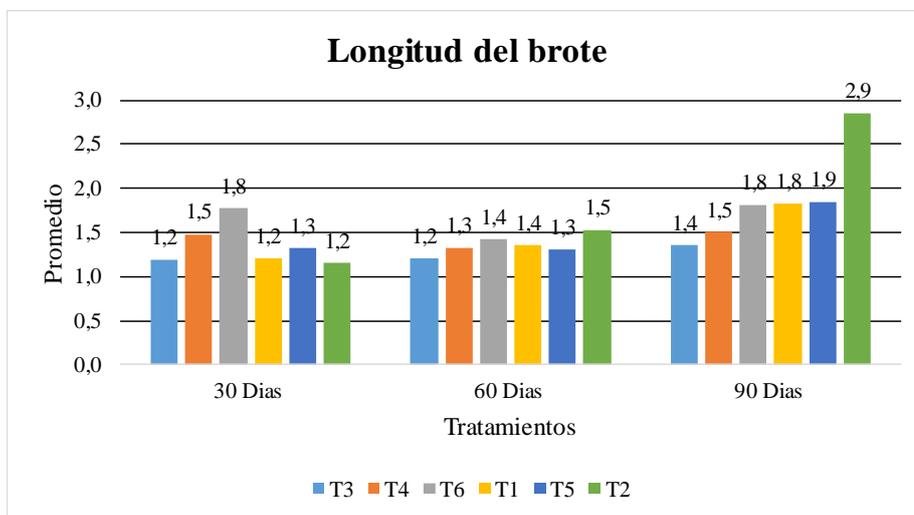
**Grafico N° 9.** Promedio de la variable Número de brotes por explante (NBE) en el cantón Guaranda, 2018.



Con los datos de la prueba de Tukey al 5% los datos registrados en esta variable Numero de brotes por explante (NBE) con datos concernientes registrados a los 60 y 90 días, el promedio más alto registrado a los 90 días fue el tratamiento T1(Bencyl adenina 1mg) y el T2 (Bencyl adenina 3mg) con 5,3 los mismo que tienen una media de 4,5 y un CV de 7,2 lo que significativamente es altamente significativo respectivamente, a los 90 días. (Cuadro N° 6 y Grafico N°9)

El numero brotes por explante dependió de las condiciones asépticas en las que fue desarrollado y el contenido de macro y micro nutrientes con los que fue formado el medio de cultivo lo que indica su desarrolló y formación a los 60 y 90 días.

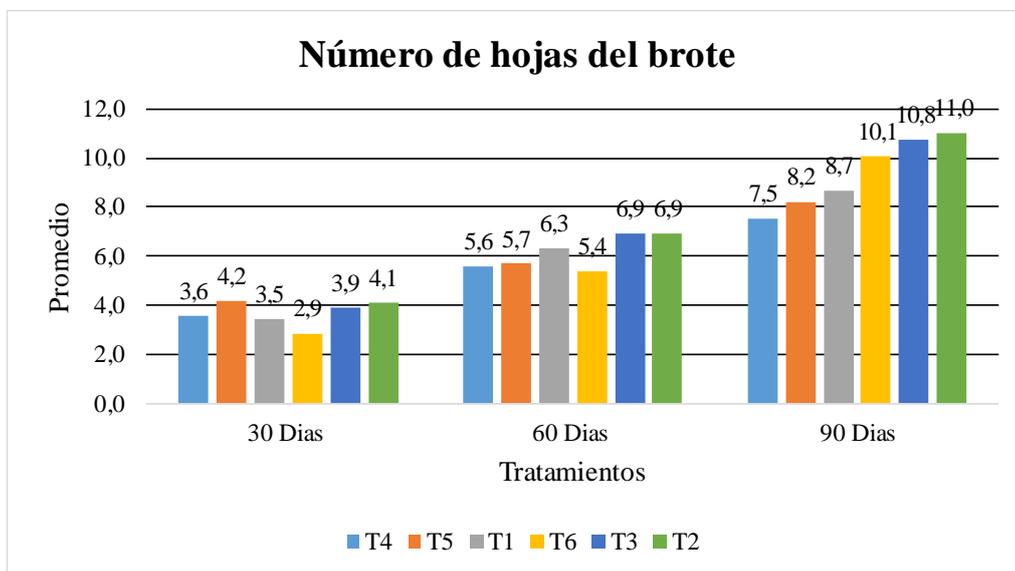
**Grafico N° 10.** Promedio de la variable longitud del brotes (LB) en el cantón Guaranda, 2018.



Con la prueba de tukey al 5% correspondientes a Longitud del brote (LB), registran en cuanto a los 30, 60 y 90 presento un desarrollo y formación adecuada, pero a los 90 días podemos indicar que el tratamiento que sobresale es el T2 (Bencyl adenina 3 mg) siendo este el mayor tamaño de longitud siendo 2,9 cm y el que presento menor longitud es el T3 con 1,4 cm, obteniendo esta variables una media general de 1,86 y el CV de 14,2% con una significancia altamente significativo (\*\*) respectivamente. (Cuadro N° 6 y Grafico N°10)

La longitud del brote es una variable que dependió de la calidad del medio de cultivo en el que se desarrolló y los cuidados sanitarios al momento de preparación.

**Grafico N° 11.** Promedio de la variable Número de hojas del brote (NHB) en el cantón Guaranda provincia de Bolívar, 2018.



Los resultados expuestos en la prueba de tukey al 5% indica que esta variable Número de hojas por explante (NHE) en cuanto a los promedios obtenidos a los 30, 60 y 90 registraron valores variados debido a su crecimiento, cabe indicar que a los 90 días el tratamiento que presenta mayor número de hojas es el T2 (Bencyl adenina 3 mg) con un total de 11 hojas respectivamente y el t4 es el que presento el menor promedio de hojas, obteniendo así una media general de 9,37 y con un CV de 6,2% lo que estadísticamente es altamente significativo (Cuadro N° 6 y Grafico N°11)

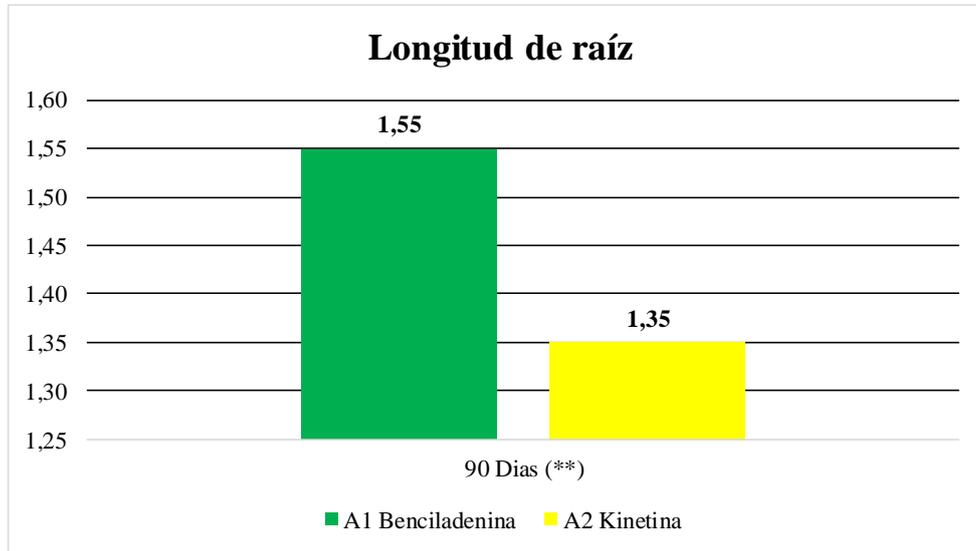
De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación el número de hojas dependió de la variable longitud de brote, ya que a mayor tamaño mayor número de hojas, y este desarrollo se complementó con los nutrientes, proteínas con los que se realizó el medio de cultivo teniendo de igual manera con los cuidados sanitarios al momento de su formación.

**Cuadro N° 7.** Resultado del análisis del efecto principal para evaluar promedios del Factor A: Citoquininas A1: Bencyl adenina, A2: Kinetina. En las variables Días a la emisión de raíces (DER) a los 30 días, Longitud de la raíz (LR), Volumen de raíz (VR) a los 90 días.

<b>DER 30 Días (NS)</b>		<b>LR 90 Días (**)</b>		<b>VR 90 Días (**)</b>	
Factor A: Citoquininas	Promedio	Factor A: Citoquininas	Promedio	Factor A: Citoquininas	Promedio
A1: Bencyn adenina	29.58	A1: Bencyn adenina	1.55	A1: Bencyn adenina	0.40
A2: Kinetina	30	A2: Kinetina	1.35	A2: Kinetina	0.50
<b>Efecto principal: A2- A1=</b>	0.42	<b>Efecto principal: A2- A1=</b>	0.20	<b>Efecto principal: A2- A1=</b>	0.10

## FACTOR A: Citoquininas

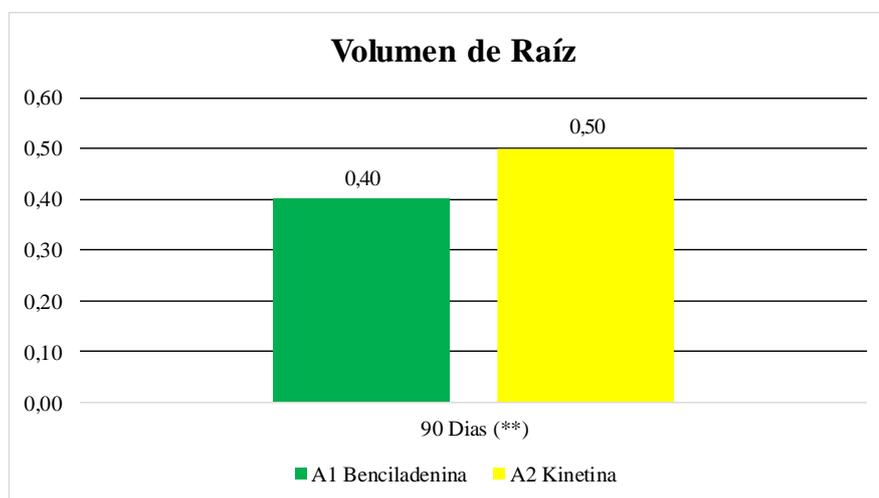
**Grafico N° 12.** Resultado de promedios del Factor A Citoquininas en la variable Longitud de raíz (LR) a los 90 días, en el cantón Guaranda, 2018.



Con el análisis del efecto principal para el factor A en la variable Longitud de raíz (LR) se evaluó la mayor longitud de raíz la cual nos indica que la hormona que sobre sale es la A1 Bencilanina con un promedio de 1,55 cm de longitud a diferencia de la A2 Kinetina, con una diferencia de 0,20 cm entre las dos, misma que registra una significancia estadística altamente significativa (\*\*) para esta variable respectivamente. (Cuadro N° 7 y Gráfico N° 12)

El Factor A1 es influyente en la formación de raíces primarias y secundarias, y en las variables antes mencionadas, para el desarrollo y crecimiento de las raíces uno de los factores principales es el medio de cultivo ya que las raíces absorben los nutrientes y ayudan a la formación de todos los organismos vegetales.

**Grafico N° 13.** Resultado de promedios del Factor A Citoquinas en la variable Volumen de raíz (VR) a los 90 días, en el cantón Guaranda provincia de Bolívar, 2018.



El Volumen de raíz (VR) registrada a los 90 presento una significancia altamente significativa (\*\*), siendo A2, Kinetina la que presento el mayor volumen de raíces 0,50 cc a diferencia de A1, Bencilanina, mostrando un valor de efecto principal de 0,10 cc. Cuadro N° 7 y Gráfico N° 13)

El volumen de la raíz ayuda a la formación de raíces secundarias las mismas que son responsables de la absorción de nutrientes del medio de cultivo en el que se están desarrollando los brotes.

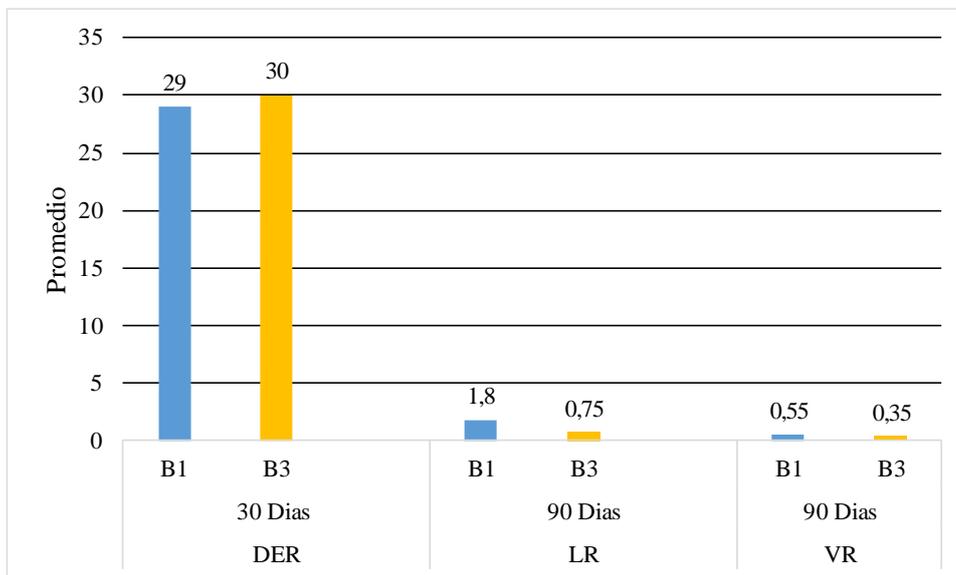
Los componentes LR y VR, son atributos varietales los cuales depende de factores físicos químicos y biológicos del medio de cultivo donde es desarrollado.

**Cuadro N° 8.** Prueba de Tukey 5 %, para comparar promedios de Factor B dosis en las variables Días a la emisión de raíces (**DER**), Longitud de la raíz (**LR**) Volumen de raíz (**VR**), 90 días.

<b>DER (NS)</b>			<b>LR (**)</b>			<b>VR (**)</b>		
<b>Factor: B Dosis</b>	<b>Promedio</b>	<b>Rango</b>	<b>Factor: B Dosis</b>	<b>Promedio</b>	<b>Rango</b>	<b>Factor: B Dosis</b>	<b>Promedio</b>	<b>Rango</b>
B1: 1mg	29.38	A	B1: 1mg	1.80	A	B1: 1mg	0.55	A
B2: 3mg	30.00	A	B2: 3mg	1.80	A	B2: 3mg	0.45	B
B3: 5mg	30.00	A	B3: 5mg	0.75	B	B3: 5mg	0.35	C

## FACTOR B: Dosis

**Gráfico N°14.** Promedio de las variables evaluadas del Factor B, Días a la emisión de raíces a los 30 días, Longitud de la raíz, y Volumen de raíz a los 90 días



Con la prueba de Tukey al 5 % de forma consistente en los tratamientos en estudio con el promedio más alto para variable días a la emisión de raíces fue B3 (5mg) con 30 días en emitir raíces de los explantes.

Se observa que los valores nutricionales del medio de cultivo y los cuidados sanitarios presentes en el crecimiento de los explantes ayudaron a la formación y emisión de raíces para cada dosis de hormonas.

El resultado de las variables longitud y volumen de raíz expuesto a los 90 días presentó los promedios más altos el B1 (1mg) con 1.8cm para longitud y 0.55 cc respectivamente.

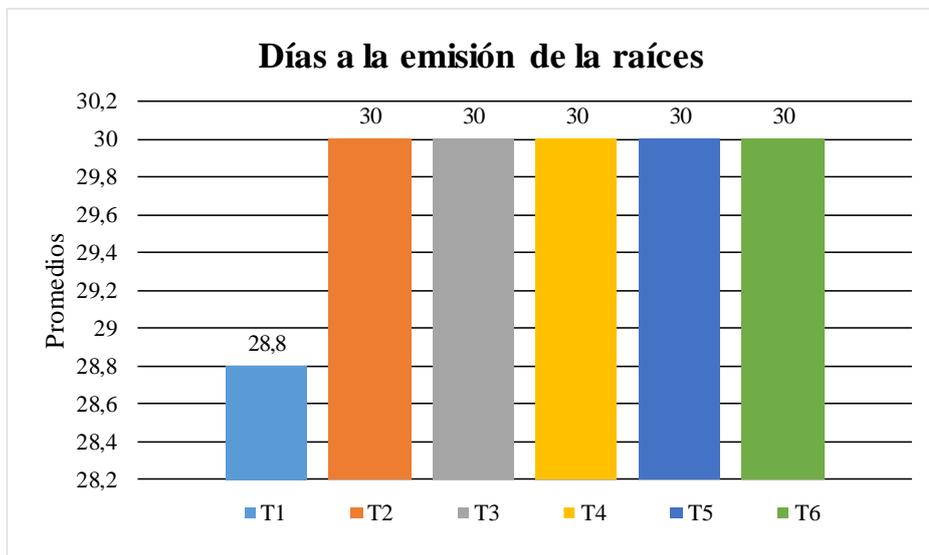
Esto es debido a que se encuentran en proceso de desarrollo y formación de plántulas, cabe indicar que se obtienen estos resultados debido a las atenciones de cuidados en medios asépticos para evitar contaminación. La longitud de la raíz ayuda a la formación de raíces secundarias por ende es responsable del volumen y espesor para sostener el brote en los frascos de medio de cultivo.

**Cuadro N° 9.** Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de tratamiento (AXB) en las variables Días a la emisión de raíces (DER) a los 30 días, Longitud de raíz (LR), Volumen de raíz (VR), a los 90 días.

DER (NS)			LR (**)			VR (**)		
Tratamiento	Promedios	Rango	Tratamiento	Promedios	Rango	Tratamiento	Promedios	Rango
T1	28.8	A	T3	0.3	E	T3	0.10	C
T2	30.0	A	T4	1.2	D	T2	0.45	B
T3	30.0	A	T6	1.3	D	T4	0.45	B
T4	30.0	A	T5	1.6	C	T5	0.45	B
T5	30.0	A	T2	2.0	B	T6	0.60	A
T6	30.0	A	T1	2.4	A	T1	0.65	A
<b>CV= 3.4 %</b>			<b>CV= 4.9 %</b>			<b>CV= 7.4 %</b>		

## TRATAMIENTOS (AxB)

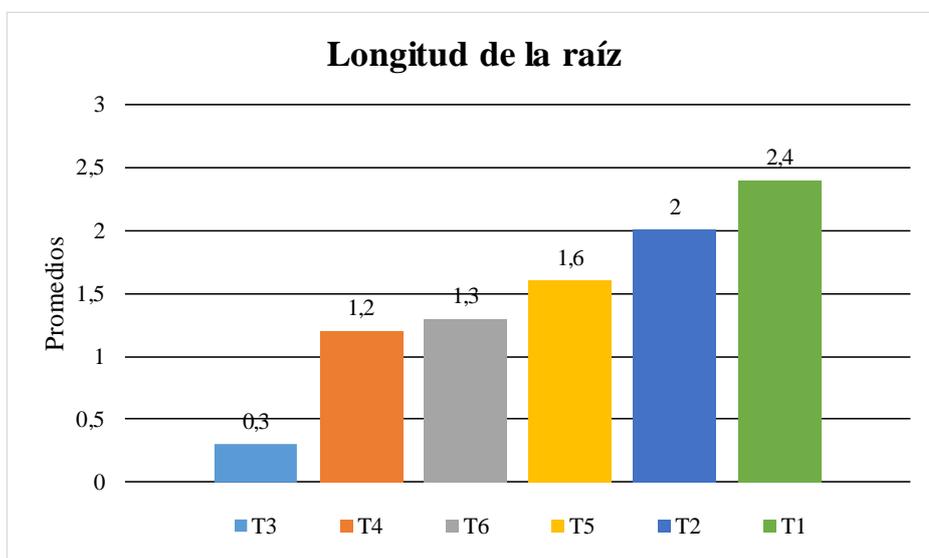
**Grafico N° 15.** Promedio de la variable Días a la emisión de raíces (DER) en el cantón Guaranda provincia de Bolívar, 2018.



Con la prueba de Tukey al 5% se registra una media general de la variable Días a la emisión de raíces (DER) 29,79 días y un CV de 3,4%, los tratamientos que registran que las raíces emitieron a los 30 días fueron T2, T3, T4, T5 y T6, excepto del T1 el cual tubo emisión de raíces a los 28 días lo que registra que estadísticamente son no significativos. (Cuadro N° 9 y Grafico N°15)

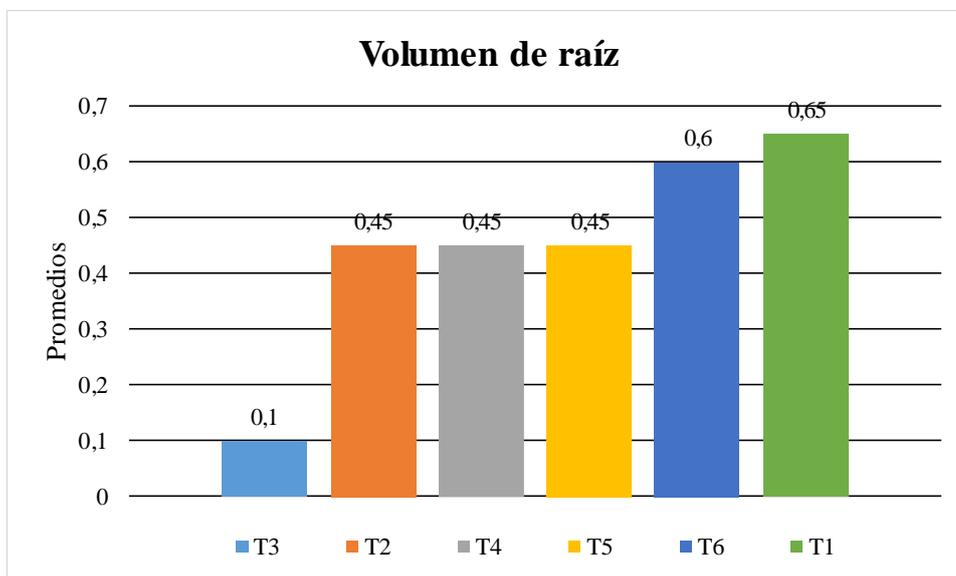
La emisión de raíces depende de la variedad de plantas madres de donde se extrajo los brotes y de las condiciones físicas para su desarrollo, de igual manera del medio de cultivo donde va a estar establecido, es decir de los nutrientes, cuidados asépticos y sanitarios.

**Grafico N° 16.** Promedio de la variable Longitud de raíz (LR), en el cantón Guaranda provincia de Bolívar, 2018.



En cuanto a la variable Longitud de raíz (LR) la media general de esta variable es de 1,45 cm, con un CV de 4,9%, lo que estadísticamente es altamente significativo (\*\*), la que indica que el tratamiento con mayor longitud de raíz T1 con 2,4 cm (Bencyl adenina 1 mg), con raíces secundarias de hasta 0,9 cm, el tratamiento con menor porcentaje de crecimiento de raíz es el T3 con 0,3 cm. (Cuadro N° 9 y Grafico N°16)

**Grafico N° 17.** Promedio de la variable Volumen de raíz (VR), en el cantón Guaranda provincia de Bolívar, 2018.



La repuesta a los tratamientos en la variable Volumen de raíz (VR), a los 90 días fue altamente significativa (\*\*), se obtuvo una media general de 0,45 cc con valores de coeficiente de variación de 7,4%. El tratamiento que sobresale es el T1 (Bencyl adenina 1 mg), con 0,65 cc y el de menor promedio el T3 con 0,1. (Cuadro N° 9 y Grafico N°17)

Sabemos que la LR y VR del sistema radicular son muy importantes para el desarrollo y formación, para la absorción de nutrientes y sostén de las plantas ya que tiene una relación directa con el crecimiento de los órganos vegetativos. El buen desarrollo radicular permite un mejor aprovechamiento del medio de cultivo.

Podemos inferir que los tratamientos presentaron este volumen de raíz en referencia a las variables (NBE), (LB), (NHB) y (LR), (Cuadro N°1). Los componentes y resultados expuestos en los tratamientos en especial en las variables (LR) y (VR) dependieron de las Citoquinas y dosis presentes en esta investigación. (Cortes, V. 2018) (Entrevista personal) (Cuadro N° 9 y Grafico N°17)

## 5.2. COEFICIENTE DE VARIACION

En ésta investigación se calcularon valores del coeficiente de variación inferior al 20%, en las variables que estuvieron bajo el control del investigador lo que es un indicador de validez y consistencia de los resultados, inferencias, conclusiones y recomendaciones obtenidas.

Únicamente se obtuvieron valores altos de los coeficientes de variación en las variables Número de Explantes contaminados (NEC) con un Cv de 28,6% y en la variable Días a la trasfencia a medios de multiplicación (DTMM) con un Cv 22,3% debido a que esta variable no está al alcance del investigador.

## 5.3. ANALISIS DE CORRELACION Y REGRESION LINEAL

Cuadro N° 3 Resultados del análisis de correlación y regresión lineal de las variables independiente (Xs) que tuvieron una relación estadística significativa con el volumen de raíz. (Variable de pendiente Y)

<b>Variables independientes ( Xs ) componentes de la Volumen de raíz</b>	<b>Coefficiente de correlación ( r )</b>	<b>Coefficiente de regresión ( b )</b>	<b>Coefficiente de determinación ( R<sup>2</sup> % )</b>
Longitud de raíz (LR)	0,811 (**)	0,1436 (**)	66

Significativo al 5% = (\*)

## 5.4. COEFICIENTE DE CORRELACION (r)

En esta investigación la variable independiente que tuvo una estrechez significativa con el volumen de raíz fue la variable longitud de raíz, es decir estas variables resultaron ser los componentes más importantes para lograr mayor estrechez con el rendimiento.

## 5.5. COEFICIENTE DE REGRESION (b)

Regresión es el incremento o disminución de la variable dependiente (Y), por cada cambio único de las variables independientes (Xs). En esta investigación las

variables que contribuyeron el incremento del Volumen de raíz fue Longitud de raíz. Por cada centímetro nos indica que incrementa la longitud de la raíz, voy a tener un incremento de 0.1436 cm en el volumen radicular

#### **5.6. COEFICIENTE DE DETERMINACION ( $R^2$ %)**

El ( $R^2$ ) explica que cada porcentaje se incrementó o disminuyó la variable dependiente (Y), por efecto de las variables independientes (Xs). En esta investigación el mayor incremento en el Volumen de raíz, o mejor ajuste, se obtuvo en la variable Longitud de raíz con un incremento del 66%.

## **VI. COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS**

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación se acepta la hipótesis alterna ya que las respuestas de la mayor cantidad de variables fueron significativas y altamente significativas.

## VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 7.1. Conclusiones

En base al análisis e interpretación de los resultados obtenidos en esta investigación se concluye lo siguiente:

- ✓ La propagación de mora de castilla (***Rubus glaucus beth***) a través de la multiplicación in vitro es viable y segura.
- ✓ El medio de cultivo que se utilizó es el adecuado para la propagación in vitro de mora
- ✓ En cuanto al Factor A Citoquininas la que sobresale es la A1 (Bencil adenina) para la formación de los explantes, de cada variable, excepto en la variable Volumen de raíz que influyo A2 Kinetina.
- ✓ Con respecto al Factor B la dosis que sobresale para el medio de cultivo es 3 mg en las variables de los tratamientos.
- ✓ En los tratamientos donde sobresale en la formación de explantes en medios de cultivo es el T1 (Bencil adenina 1mg)
- ✓ El tratamiento que presento mayor contaminación de brotes fue el T1 adenina con 1mg
- ✓ En esta investigación el mayor incremento en el Volumen de raíz, o mejor ajuste, se obtuvo en la variable Longitud de raíz con un incremento del 66%.
- ✓ Trabajar en la formación de medios de multiplicación para la desarrollo y mejora de productos alimentarios y obtener así mejoras en la soberanía alimentaria

## 7.2. Recomendaciones

En base a las diferentes conclusiones sintetizadas en esta investigación se recomienda:

- ✓ Extraer explantes de plantas madre seleccionadas de buena calidad, libres de plagas y enfermedades, evitando todo tipo de contaminación, de la misma manera protegerlas hasta el momento de la extracción y desinfección de explantes.
- ✓ A las plantas madre se deben realizar aplicaciones fitosanitarias con fungicidas y bactericidas ocho días antes de obtener los explantes, para evitar contaminación in vitro.
- ✓ Realizar combinaciones con otros reguladores de crecimiento.
- ✓ Descubrir nuevas hormonas con sus respectivas dosis para la implementación de medios de cultivo, que tiendan a bajar los costos de producción.
- ✓ Utilizar la hormona Citoquinina Bencyl adenina en dosis de 1mg a 3 mg, ya que estas aportan a la formación de nuevas plantas in vitro.
- ✓ Continuar con investigaciones sobre multiplicación in vitro de otros cultivos para que de esta manera se mejore la calidad y productividad y de la seguridad alimentaria de nuestro país.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

1. **Ancora, G. et al. 2004.** Biotecnologías animales y vegetales, nuevas fronteras y nuevas responsabilidades. Primera edición. P. 15.
2. **Arbeláez, L. 2008.** Micropropagación de *Rubus Glaucus Benth* sin agujones en medio sólido y por inmersión temporal. Universidad Tecnológica de Pereira. (En línea) el 22 de noviembre del 2004.
3. **Cano, S. 2006.** Metodos de Analisis Micrologico. Normas ISO, UNE. Departamento de formación. Guatemala. Pp. 15 – 23 – 45.
4. **Casaca, A. 2005.** El cultivo de la mora. *Rubus Glaucus*. Secretaría de Agricultura y Ganadería. Costa Rica, proyecto de modernización de los servicios de tecnología agrícola. Pp. 4 -8
5. **Castillo, A. 2016** Propagacion de plantas por cultivo in vitro. Departamento de biotecnología, Ambato Ecuador. INIAP. Pp. 6 – 28 – 35.
6. **Castro, R. 2007.** Alternativas para el manejo integrado del cultivo de la mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*). Antioquia, CO. Universidad Católica de Oriente. Pp. 28-34.
7. **Cerdas, M. 2005.** Mora (*Rubus spp.*) Cultivo y manejo Poscosecha. San José, CR: Ministerio de Agricultura y Ganadería. Pp. 25-28
8. **Cervantes, Y. et al 2013.** Biología Aplicada, Adaptación del Material In vitro, Cuba. P 5.
9. **Cleand, E. 2015.** Fisiología vegetal (Vol. 10). Universitat Jaume I. (En línea) [http://usvarios. Netgate.com. uy/emonteiro/moral. htm](http://usvarios.Netgate.com.uy/emonteiro/moral.htm)
10. **Cruz, F. 2012.** Cultivo de Tejido Vegetal. Perú Lima Pp. 4 – 10 – 14.

11. **Enrique, C. 2012.** Micropropagacion de Arundo donax a partir de yemas axilares y meristemas apicales. Zamorano departamento de ciencia y producción agropecuaria, Zamorano, Honduras. P 34
12. **Esteves, D. et al 2007.** Nuevas alternativas en la preparación de los medios de cultivo con la utilización del extracto de Aloe vera L.
13. **Ewind, G. et al 2008.** Plant Propagation by tissue culture Volume 1. Ed. Klerk
14. **Giraldo, M. 2006.** El cultivo de la mora. Manizales, CO. CORPOICA. P. 129.
15. **Iáñez, E. 2018.** Cursos de microbiología general. Hipertextos del área de la biología En línea [http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/16\\_micro.htm](http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/16_micro.htm)
16. **INFOAGRO. 2018** <https://quimica.unam.mx/investigacion/servicios-para-la-investigacion/cultivo-de-tejidos-vegetales/>
17. **Imbrogno, L. et al. 2013.** Efectos de los Medios de Cultivo en la elongación In vitro de Brotes, Biotecnología Vegetal, Colombia Bobota Vol 13 No. 3, P. 2.
18. **Lagos, C. 2013.** Evaluación de medios de cultivo para propagación in vitro de semillas y explantes de especies silvestres de Solanum, Acta Agronómica, volumen 62, número 1, p 27-36.
19. **Ledin, B. 2005.** Rubur trials in South Florida (en inglés). Florida State Horticultural Society. Sub-Tropical experiment Station. Pp. 272-274.
20. **Luther, M. 2017.** Protocolos de desinfección de explantes durante la micropropagación de Cedrela odorata L. Conference: Conference: 11no. Congreso Internacional de Biotecnología y Agricultura. Cuba.

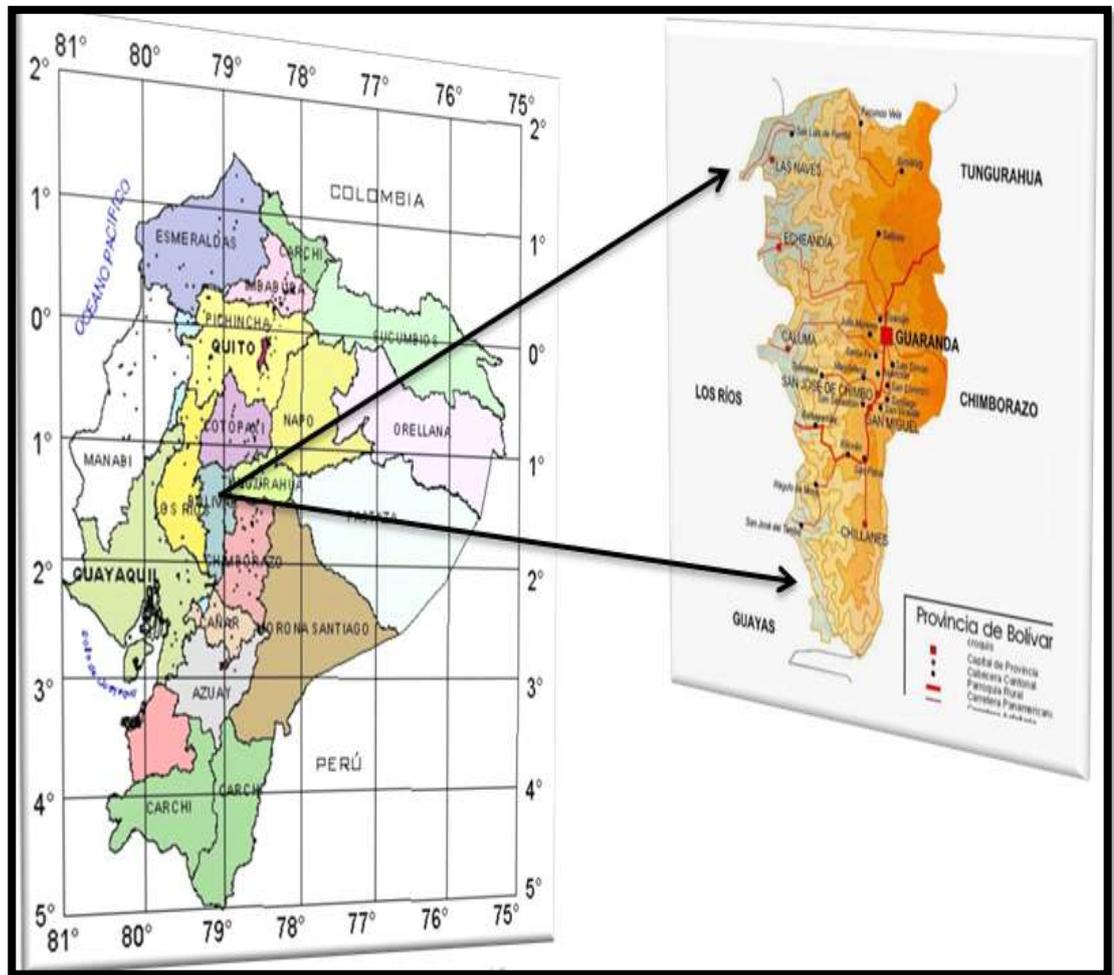
- 21. Martínez, A. et al 2007.** Manual del cultivo de la mora de castilla. Convenio INIAP-UTA. Ambato-Ecuador, Pp.9-16.
- 22. Malojovich, M. 2017.** Guía técnica, Fundamentos Biológicos, Micropropagación. México. Pp 3-5
- 23. Monteiro, M. 2004.** Cultivo de mora. (En línea). Consultado 23 de diciembre. 2014
- 24. Muralanda, A. et al 2005.** Caracterización molecular con microsatélites aleatorios RAMs de la colección de mora, *Rubus* spp, de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. *Acta Agronómica*, 54(2), Pp 15- 24.
- 25. Murashige, T.; Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15: Pp.473-497.
- 26. Olmos, S. et al. 2012.** Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II, Métodos de propagación y conservación de germoplasmas. Costa Rica. P. 14
- 27. Patiet, C.; Humberto, L. 2004.** Uso de una fitohormona y tres tipos de sustratos en el enraizamiento de estacas de mora de castilla (*Rubus glaucus* benth) (Bachelor's thesis, Quevedo: UTEQ).
- 28. Racines, M. et al 2012.** Estudio de costos y rentabilidad de cuatro frutales andinos. (aguacate, durazno, mora y tomate de árbol), que utilicen las tecnologías INIAP, en las provincias de Carchi, Pichincha, Imbabura y Tungurahua.
- 29. Ramirez, T. et al. 2009.** Perfil de mora. CORPEI. Extraído el 18 de noviembre, 2016.
- 30. Roca, W. 2013.** Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones (No. 151). Ciat.

31. **Sergrein, M. 2017.** Argenbio, Los Cultivos Celulares y sus Aplicaciones II. Panama. Pp 3 – 5.
32. **Suquillo, V. et al 2012.** Regeneración de plantas completas de rubus glaucus (benth), mediante el uso de reguladores de crecimiento (Bachelor's thesis, 2012).
33. **TECA. 2018.** Tecnologías y Practicas para pequeños productores agrarios. Guía Agrícola. Cultivo de Tejidos Vegetales. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
34. <https://es.scribd.com/doc/71499886/Aclimataciondeplantulasproducidasinvitro>
35. <http://fisiologiavegetal.blogspot.com/2012/10/citocininas.hyml>
36. [https://www.ecured.cu/Medios\\_de\\_cultivo\\_para\\_la\\_propagacio%C3%B3n\\_in\\_vitro](https://www.ecured.cu/Medios_de_cultivo_para_la_propagacio%C3%B3n_in_vitro)
37. <http://biotecnologia-itca.blogspot.com/2012/02/2-1-4componentesdelmediodecultivo.html>
38. <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/murashigeandskoogmsmedium.html>
39. <http://alvaradobiotech.blogspot.com/2013/02/tarea-medios-de-cultivo.html>
40. <http://www.redagricola.com/cl/reguladoresdecrecimientoybioestimulantes.html>
41. <https://www.horticultivos.com/nutricion/aplicacion-hormonas-vegetales.html>
42. [http://www.infoagro.com/frutas/reguladores\\_crecimiento.html](http://www.infoagro.com/frutas/reguladores_crecimiento.html)
43. <http://universobotanico.blogspot.com/2014/02/cultivo-de-plantas-in-vitro.html>
44. <https://tecnoagro.com.mx/revista/2018/no124/etapasdemicropropagacion.html>
45. [https://www.fenotipo.com/interaccin\\_entre\\_genotipo\\_y\\_ambiente.html](https://www.fenotipo.com/interaccin_entre_genotipo_y_ambiente.html)

46. <https://www.eumed.net/rev/oel/2018/02/produccionmoraagricultores.html>
47. [http://extension.illinois.edu/beyond\\_sp/matching.cfm.html](http://extension.illinois.edu/beyond_sp/matching.cfm.html)
48. [https://sabiduriaenlahistoria.wordpress.com/2016/05/19/estadosanitariodelaspl  
antas.html](https://sabiduriaenlahistoria.wordpress.com/2016/05/19/estadosanitariodelaspl<br/>antas.html)

# ANEXOS

## Anexo 1. Mapa de ubicación del ensayo



**Anexo 2. Base de datos de variables en estudio**

R	FA	FB	NEC	DTMM	60 DIAS	90DIAS	30DIAS	60 DIAS	90 DIAS	30DIAS	60 DIAS	90 DIAS	30 DIAS	90 DIAS	90 DIAS
					NBE	NBE	LB	L B	L B	NHB	NHB	NHB	DER	LR	V R
1	1	1	0	30	2,8	5,30	1,22	1,56	1,74	3,2	6,2	8,80	25	2,4	0,65
1	1	2	4	30	2,6	5,30	1,26	1,52	3,11	4,5	7,2	11,10	30	2	0,45
1	1	3	4	45	3,44	4,90	0,93	1,04	1,39	3,6	7,5	10,50	30	0	0
1	2	1	2	25	1,5	3,90	2,28	1,4	1,61	2,6	5	7,70	30	1,2	0,45
1	2	2	8	30	0,75	2,80	1,56	1,7	1,98	4,3	5,37	8,80	30	1,6	0,45
1	2	3	2	30	1,1	4,20	1,33	1,53	1,67	3,4	5,5	10,20	30	1,25	0,6
2	1	1	1	30	3,2	5,40	1,15	1,25	2,10	3,2	7	9,20	30	2,4	0,65
2	1	2	4	45	1,5	5,60	1,22	1,7	3,00	4	6,06	10,50	30	2	0,45
2	1	3	5	30	2,6	5,20	1,08	1,06	1,20	4,5	6,25	12,00	30	0,4	0,2
2	2	1	3	30	0,8	3,40	0,9	1,35	1,50	2,6	6	8,20	30	1,2	0,45
2	2	2	3	45	1,3	2,60	1	1,59	1,56	3,5	6,2	7,50	30	1,6	0,45
2	2	3	1	40	3,4	5,00	2,2	1,03	2,00	2,5	5,2	9,80	30	1,25	0,6
3	1	1	1	30	4,5	5,20	1,43	1,12	1,73	4,2	6,5	8,50	30	2,4	0,65
3	1	2	2	30	4,2	5,00	1,12	1,7	2,10	4,3	7	11,20	30	2	0,45
3	1	3	0	30	2,6	4,90	1,4	1,15	1,40	4	6,5	10,00	30	0,3	0,1
3	2	1	7	45	3,43	4,00	1,5	1	1,30	4,5	6	7,70	30	1,2	0,45
3	2	2	1	30	1,5	3,20	1,26	0,93	2,00	4,5	6,2	8,20	30	1,6	0,45
3	2	3	1	30	3,2	4,40	2,2	1,56	1,90	2,3	5,3	10,20	30	1,25	0,6
4	1	1	4	25	5,2	5,20	1	1,45	1,72	3,2	5,5	8,20	30	2,4	0,65
4	1	2	1	30	1,25	5,30	0,98	1,2	3,20	3,6	7,4	11,20	30	2	0,45
4	1	3	3	30	2,15	4,90	1,35	1,54	1,40	3,4	7,5	10,50	30	0,3	0,1
4	2	1	4	30	3,4	3,80	1,24	1,56	1,60	4,5	5,35	6,50	30	1,2	0,45
4	2	2	2	30	4,6	3,00	1,44	1,03	1,85	4,3	4,95	8,30	30	1,6	0,45
4	2	3	2	45	2,6	5,50	1,33	1,56	1,67	3,2	5,5	10,00	30	1,25	0,6

### **Anexo 3. Códigos de variables en estudio**

**NEC** = Número de explantes contaminados

**DTMM** = Días a la transferencia a medios de multiplicación

**NBE** = Número de brotes por explantes

**LB** = Longitud del brote

**NHB** = Número de hojas del brote

**DER** = Días a la emisión de raíces

**LR** = Longitud de la raíz

**VR** = Volumen de la raíz

**Anexo 4. Fotografías de la investigación**

<p><b>1. Recolección de material vegetativo</b></p>	<p><b>2. Protección del material vegetativo en el campo</b></p>
	
<p><b>3. Selección de brotes</b></p>	<p><b>4. Desinfección de brotes</b></p>
	

**5. Desinfección de brotes en la cámara de flujo laminar**



**6. Preparación de medios de multiplicación**



**7. Ubicación de explante en medio de cultivo**



**8. Brotes ubicado por tratamientos y repeticiones**



**9. Ubicación de letreros y etiquetas por tratamientos**



**10. Visita del tribunal en el laboratorio**



**11. Muestra de explante contaminado**



**12. Explante a los 90 días**



## **Anexo 5. Glosario de términos técnicos**

**Auxinas.** - Las auxinas (ácido indolacético) actúan como reguladores del crecimiento vegetal. Lo que hacen, en términos básicos, es aumentar el tamaño de las células, por lo que se traduce en un mayor tamaño de la planta. Además, retrasa la caída de las hojas, promueve el crecimiento del fruto y el crecimiento de raíces laterales, etc.

**Asepsia.** - Sin infección o contaminación de microorganismos.

**Biología.** - Toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos u organismos vivos, partes de ellos o sus derivados, para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos.

**Citoquininas.** - Las citoquininas o citocininas son un grupo de hormonas vegetales que promueven la división y la diferenciación celular. Son hormonas fundamentales en el proceso de orgnógenesis en las plantas y en la regulación de diversos procesos fisiológicos como la fotosíntesis.

**Clon.** - En la terminología de cultivo de células animal, es una población

**Contaminación.** - Presencia de plagas u otros artículos reglamentados en un producto básico, lugar de almacenamiento, medio de transporte o contenedor, sin que constituya una infestación.

de células derivadas de una única célula por mitosis. Un clon, no es necesariamente homogéneo, por lo tanto, los términos clon y clonado no indican uniformidad genética de la población celular. En la terminología de cultivo vegetal, el término puede referirse a lo ya explicado o estar referido a un grupo de plantas propagadas solamente por medio vegetativo o asexual, todos los miembros provienen de una propagación repetida desde un único individuo.

**Explanto.** - Tejido obtenido de su sitio original y transferido a un medio artificial para crecimiento (proliferación) o mantenimiento (conservación).

**Fitohormonas.** - Sustancias químicas producidas por algunas células vegetales en sitios estratégicos de la planta y estas hormonas vegetales son capaces de regular de manera predominante los fenómenos fisiológicos de las plantas.

**Germoplasma.** -Conjunto formado por el total del material hereditario o banco genético, que contiene todas las posibles variaciones que presentan una o varias especies, poblaciones y grupos, entre otros.

**Giberelinas.** - La giberelina es una fitohormona producida en la zona apical, frutos y semillas. Sus principales funciones son la interrupción del período de latencia de las semillas, haciéndolas germinar, la inducción del desarrollo de yemas, frutos y la regulación del crecimiento longitudinal del tallo como así también la elongación de órganos axiales: pecíolos, pedúnculos, etc.

**In vitro.**- Estas técnicas pueden ser utilizadas en vegetales como herramientas para micropropagación, propagación rápida de clones, eliminación de virus y enfermedades, producción de haploides, aislamiento y utilización de protoplastos, cultivo de embriones, producción de fitoquímicos, ingeniería genética, mutación y selección celular, producción de semillas sintéticas y estudios básicos de anatomía, desarrollo, fisiología y nutrición vegetal.

**Laboratorio.** - Es un lugar que se encuentra equipado con los medios necesarios para llevar a cabo experimentos, investigaciones o trabajos de carácter científico o técnico. En estos espacios, las condiciones ambientales se controlan y se normalizan para evitar que se produzcan influencias extrañas a las previstas, con la consecuente alteración de las mediciones, y para permitir que las pruebas sean repetibles.

**Meristema brote apical.** - Tejido indiferenciado, localizado dentro del brote apical, generalmente aparece como una estructura brillante distante del primordio foliar y mide menos de 0,1 mm de longitud cuando se lo extrae.

**Micropropagación.** - Propagación clonal "in vitro" de plantas a partir de brotes apicales o explantes nodales, usualmente con proliferación acelerada de brotes durante los subcultivos.

**Organismo Vivo.** - Se entiende cualquier entidad biológica capaz de transferir o replicar material genético, incluidos los organismos estériles, los virus y los viroides.

**Propagación "in vitro".** - Propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, usando recipientes plásticos o de vidrio, técnicas de asepsia y un medio de crecimiento definido.

**Sub-cultivos.** - El número de veces que las células en cultivo son subcultivadas o repicadas. En la descripción de este proceso, la proporción o dilución de células se establece de acuerdo a la edad relativa del cultivo.

**Tejidos.** - Se define como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante, o sea, una parte separada del vegetal, tales como protoplastos, células, tejidos u órganos se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas.

**Totipotente.** - Una característica celular, en la cual se conserva la potencialidad de formar todo tipo de células del organismo adulto.

**Vegetales.** - Las plantas vivas y las partes vivas de las plantas, incluidas las semillas.

**Vitaminas.** - Es un término compuesto formado por el vocablo latino vita ("vida") y por el concepto químico amina. Las vitaminas son las sustancias orgánicas que están presentes en los alimentos y que resultan necesarias para el equilibrio de las funciones vitales

**Yemas.** - Es un órgano complejo de las plantas que se forma habitualmente en la axila de las hojas formado por un meristemo apical, (células con capacidad de división), a modo de botón escamoso (catáfilos) que darán lugar a hojas (foliíferas) y flores (floríferas). El color de las yemas sirve para identificar las especies.