



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR

**Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y
del Ambiente**

Carrera Ingeniería Agronómica

TEMA: EVALUACIÓN DE LAS PLANTULAS DE FRAMBUESA
(Rubus idaeus. L) PROPAGADAS MEDIANTE LA
MULTIPLICACIÓN IN VITRO, UTILIZANDO TRES TIPOS DE
CITOQUININAS EN CUATRO DOSIS EN LAGUACOTO III,
CANTÓN GUARANDA PROVINCIA DE BOLÍVAR.

Proyecto de Investigación 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, Carrera de Ingeniería Agronómica.

AUTORES:

Heidy Nataly Duque Paredes

Romel Paul Monar Gavilanez

DIRECTORA:

Ing. Sonia Salazar Ramos Mg

Guaranda – Ecuador

2022

EVALUACION DE LAS PLANTULAS DE FRAMBUESA (*Rubus idaeus. L*)
PROPAGADAS MEDIANTE LA MULTIPLICACIÓN IN VITRO,
UTILIZANDO TRES TIPOS DE CITOQUININAS EN CUATRO DOSIS EN
LAGUACOTO III, CANTÓN GUARANDA PROVINCIA DE BOLÍVAR.

REVISADO Y APROBADO POR:



ING. SONIA SALAZAR RAMOS Mg.
DIRECTORA



ING. JOSÉ SÁNCHEZ MORALES Mg.
BIOMETRISTA



ING. RODRIGO YÁNEZ GARCÍA Mg.
REDACCIÓN TÉCNICA



CERTIFICADO DE AUTORÍA

Nosotros, Heidy Nataly Duque Paredes con C.I. 172500221-4 y Romel Paul Monar Gávilánez con C.I. 025001036-0 declaramos que el trabajo y los resultados presentados en este informe, no han sido previamente presentados 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, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, su Reglamentación y la Normativa Institucional vigente

HEIDY NATALY DUQUE PAREDES

ROMEL PAUL MONAR GAVILANEZ

C.I 172500221-4

C.I 025001036-0

ING. SONIA SALAZAR RAMOS Mg.

ING. JOSÉ SÁNCHEZ MORALES Mg.

CI: 020093306-7

C.I 180153798-4

DIRECTORA

ÁREA BIOMETRIA

ING. RODRIGO YÁNEZ GARCÍA Mg.

CI: 020050222-7

ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA





Notaria Tercera del Cantón Guaranda
Msc. Ab. Henry Rojas Narvaez
Notario



00000

....rio

N° ESCRITURA 20220201003P00811

DECLARACION JURAMENTADA

OTORGADA POR: HEIDY NATALY DUQUE PAREDES y ROMEL PAUL MONAR GAVILANEZ

INDETERMINADA DI: 2 COPIAS H.R. Factura: 001-006 -0000001109

En la ciudad de Guaranda, capital de la provincia Bolívar, República del Ecuador, hoy día diez de Mayo del dos mil veintidós, ante mi Abogado HENRY ROJAS NARVAEZ, Notario Público Tercero del Cantón Guaranda, comparecen los señores HEIDY NATALY DUQUE PAREDES, soltera, de ocupación estudiante, por sus propios derechos, celular (0987743072), domiciliada en Tambillo, de la Cuidad de Quito y de paso por este lugar, ROMEL PAUL MONAR GAVILANEZ, soltero, por sus propios derechos de ocupación estudiante, domiciliado en la parroquia San Simón del Cantón Guaranda Provincia Bolívar, con celular número (0959186329), obligarse a quienes de conocerles doy fe en virtud de haberme exhibido sus documentos de identificación y con su autorización se ha procedido a verificar la información en el Sistema Nacional de Identificación Ciudadana; bien instruidos por mí el Notario con el objeto y resultado de esta escritura pública a la que procede libre y voluntariamente, advertidos de la gravedad del juramento y las penas de perjurio, me presenta su declaración Bajo Juramento declaran lo siguientes "Previo a la obtención del título de Ingenieros Agrónomos, manifestamos que el criterio e ideas emitidas en el presente trabajo de investigación titulado "EVALUACIÓN DE LAS PLANTULAS DE FRAMBUESA (*Rubus idaeus.L*) PROPAGADAS MEDIANTE LA MULTIPLICACIÓN IN VITRO, UTILIZANDO TRES TIPOS DE CITOQUININAS EN CUATRO DOSIS EN LAGUACOTO III, CANTÓN GUARANDA PROVINCIA BOLIVAR." es de nuestra exclusiva responsabilidad en calidad de autores, previo a la obtención de título de Ingenieros Agrónomos, en la universidad Estatal de Bolívar. Es todo cuanto podemos declarar en honor a la verdad, la misma que la hacemos para los fines legales pertinentes. HASTA AQUÍ LA DECLARACIÓN JURADA. La misma que elevada a escritura pública con todo su valor legal. Para el otorgamiento de la presente escritura pública se observaron todos los preceptos legales del caso, leída que les fue a los comparecientes por mí el Notario en unidad de acto, aquella se ratifica queda incorporada al protocolo de esta notaria y firma conmigo de todo lo cual doy Fe.

HEIDY NATALY DUQUE PAREDES

C.C. 172500221-4

ROMEL PAUL MONAR GAVILANEZ

C.C. 0250010360

AB. HENRY ROJAS NARVAEZ

NOTARIO PUBLICO TERCERO DEL CANTON GUARANDA

Minotar (minotar@ueh.edu.ec)

Lista de fuentes Bloques

95%	71111922031372112232404047511317230305761310711020
95%	71111922031372112232404047511317230305761310711020
95%	71111922031372112232404047511317230305761310711020
95%	71111922031372112232404047511317230305761310711020
95%	71111922031372112232404047511317230305761310711020
95%	71111922031372112232404047511317230305761310711020
95%	71111922031372112232404047511317230305761310711020

Documento: EVALUACION DE LAS PLANTULAS DE FRAMBUESA (RUBUS IDAEUS L.) PROPAGADAS MEDIANTE LA MULTIPLICACION IN VITRO, UTILIZANDO TRES TIPOS DE OTOQUININAS EN CUATRO DOSIS EN LAGUACOTO III, CANTON GUARANDA, PROVINCIA DE BOLIVAR. IRI (0130047995)

Presentado por: hrdique@gmail.com

Recibido: minotar@ueh.edu.ec

5% de estas 33 paginas se componen de texto presente en 8 fuentes.

90% Activo

UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente Carrera Ingeniería Agronómica TEMA

EVALUACION DE LAS PLANTULAS DE FRAMBUESA (RUBUS IDAEUS L.) PROPAGADAS MEDIANTE LA MULTIPLICACION IN VITRO UTILIZANDO TRES TIPOS DE OTOQUININAS EN CUATRO DOSIS EN LAGUACOTO III, CANTON GUARANDA, PROVINCIA DE BOLIVAR

Proyecto de investigación 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, Carrera de Ingeniería Agronómica. AUTORES: Heidy Nataly Duque Paredes, Romel Paul Monar Gavilanez DIRECTORA: Ing. Sonia Salazar Ramos Ing. Guadalupe - Ecuador 2022

EVALUACION DE LAS PLANTULAS DE FRAMBUESA (RUBUS IDAEUS L.) PROPAGADAS MEDIANTE LA MULTIPLICACION IN VITRO UTILIZANDO TRES TIPOS DE OTOQUININAS EN CUATRO DOSIS EN LAGUACOTO III, CANTON GUARANDA, PROVINCIA DE BOLIVAR

REVISADO Y APROBADO POR: ING. SONIA SALAZAR RAMOS Ing. DIRECTORA ING. JOSE SANCHEZ MORALES Ing. B. INMETRISTA ING. RODRIGO YANEZ

GARCIA Ing. REDACCION TECNICA

III CERTIFICADO DE AUTORÍA Nosotros, Heidy Nataly Duque Paredes con C.I. 172500221, y Romel Paul Monar Gavilanez con C.I. 925001039-0 (delarremo)

que el trabajo y los resultados presentados en este informe, no han sido previamente presentados para ningún grado o calificación profesional; y que las referencias bibliográficas que se incluyen no han sido consultadas y citadas con su respectivo autor. La Universidad Estatal de Bolívar, puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, su Reglamentación y la Normativa Institucional vigentes.

Archivo de registro Uniuend: UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR / Proyecto de Titulación Completo gero 2017 tomate de ali 90%

UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS, RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE, CARRERA DE INGENIERIA AGRONOMICA TEMA

Heidy Nataly Duque Paredes
ING. SONIA SALAZAR RAMOS
DIRECTORA

Rodrigo Yáñez
ING. RODRIGO YÁNEZ
ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA

DEDICATORIA

Agradecer a Dios por permitirme llegar a este gran día, donde veo plasmado el esfuerzo y esmero de mi padre Oswaldo Duque y mi madre Elisa Paredes quienes con su ejemplo me han enseñado que cada sueño se lo puede realizar con perseverancia, paciencia y amor; a mis hermanas Greis, Helen y sobrina Sofía por ser parte de este sueño quienes con su ayuda y consejos me han llevado por el camino del bien y me enseñaron a no renunciar alentándome en mis logros y fracasos.

A mi compañero de tesis Paul Monar quien ha estado en este largo camino y junto a el emprendimos este sueño ha sido parte de mi crecimiento tanto personal como académico un gran apoyo. A nuestros amigos quienes ayudaron con un granito de arena para que esto fuera posible.

Heidy Nataly Duque Paredes

DEDICATORIA

Agradecer a Dios por haberme guiado siempre por el camino de bien dándome fuerzas para culminar esta etapa de mi vida.

Agradecer a mis padres Consuelo Gavilánez y Eduardo Monar por ser los pilares fundamentales en mi vida, dando siempre su mejor esmero para que pudiera cumplir cada uno de mis sueños, enseñándome que no hay que desfallecer ni rendirme ante nada por más dura que este la situación.

Mis hermanos Marcela, Carmen, Flavio y primo Manuel Monar por brindarme siempre su apoyo en todo momento. A mi compañera de tesis Heidy Duque pese a muchas adversidades estuvo acompañándome siendo un apoyo en este largo camino.

Romel Paul Monar Gavilánez

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente, en especial a la Carrera de Ingeniería Agronómica y a sus docentes por haber contribuido con los conocimientos para nuestra formación profesional.

De manera especial a nuestra Directora del Proyecto, Ing. Sonia Salazar por brindarnos su apoyo incondicional en la realización de este proyecto de titulación.

De la misma manera a nuestros Miembros del Tribunal Ing. José Sánchez (Biometrista), Ing. Rodrigo Yáñez (Área de Redacción Técnica) quienes contribuyeron en la planificación, ejecución y sistematización de esta investigación.

Al laboratorio de Biotecnología, por la colaboración para la realización del proyecto, especialmente al Ing. Víctor Hugo Cortez quien brindó sus conocimientos para llevar a término nuestra investigación.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN Y SUMMARY	xix
RESUMEN	xix
SUMMARY	xx
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PROBLEMA	3
III. MARCO TEÓRICO	5
3.1 Origen	5
3.2 Taxonomía	5
3.3 Descripción botánica	5
3.3.1 Sistema radicular	5
3.3.2 Tallo	6
3.3.3 Hojas	6
3.3.4 Flores	6
3.3.5 Fruto	6
3.4 Requerimientos edafoclimáticos	7
3.4.1 Altitud	7
3.4.2 Precipitación y humedad relativa	7
3.4.3 Temperatura	7
3.4.4 Clima	7

3.4.5	Suelo.....	7
3.5	Variedades	8
3.6	Sistema de propagación	8
3.6.1	Sistema tradicional de propagación de frambuesa	8
3.6.2	Sistema mejorado	8
3.7	Micropropagación	9
3.7.1	Etapas de la propagación in vitro	9
3.7.2	Medio de cultivo	13
3.7.3	Medio de cultivo Sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) en (mg/l)	14
3.7.4	Micronutrientes en mg/l	14
3.7.5	Vitaminas en mg/l.....	15
3.7.6	Elaboración de soluciones madre del medio de cultivo murashige y skoog	15
3.7.7	Reguladores de crecimiento.....	15
3.7.8	Citoquininas	16
3.8	Plagas y enfermedades del cultivo de frambuesa	16
3.8.1	Plagas	16
3.8.2	Enfermedades.....	17
IV.	MARCO METODOLÓGICO	19
4.1	Materiales	19
4.1.1	Ubicación de investigación	19

4.1.2	Situación geográfica y climática	19
4.1.3	Zona de vida	19
4.1.4	Materiales experimentales.....	20
4.1.5	Materiales de campo	20
4.1.6	Materiales de laboratorio	20
4.1.7	Materiales de oficina	22
4.2	Métodos.....	22
4.2.1	Factores en estudio.....	22
4.2.2	Tratamientos	22
4.2.3	Tipo de diseño experimental	23
4.2.4	Procedimiento	23
4.2.5	Tipo de análisis	24
4.3	Métodos de evaluación y datos a tomarse	24
4.3.1	Días a la brotación en laboratorio (DBL).....	24
4.3.2	Número de brotes por explante (NBE).....	24
4.3.3	Número de hojas por brote (NHB)	25
4.3.4	Altura de brotes (AB).....	25
4.3.5	Taza de velocidad de multiplicación (TVM)	25
4.3.6	Número de frascos contaminados (NFC)	25
4.3.7	Número de Raíces (NR)	26
4.3.8	Tamaño de Raíz (TR).....	26

4.3.9	Volumen de Raíz (VR)	26
4.4	Manejo del experimento.....	26
4.4.1	Selección de las plantas.....	26
4.4.2	Recolección de muestras	26
4.4.3	Establecimiento del sistema de asepsia	27
4.4.4	Preparación del medio de cultivo.....	27
4.4.5	Preparación para los reguladores de crecimiento.....	29
4.4.6	Esterilización del medio de cultivo	29
4.4.7	Introducción al medio de cultivo	30
4.4.8	Transferencia del material vegetal.....	30
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
5.1	Número de frascos contaminados (NFC), Días a la brotación en laboratorio (DBL) y Número de brotes por explantes (NBE).	31
5.2	Número de hojas por brote (NHB), altura de brotes (AB) y tasa de velocidad de multiplicación (TVM).....	39
5.3	Número de raíz (NR), tamaño de raíz (TR) y volumen de raíz (VR). 47	
5.4	Análisis económico de la relación B/C	55
5.4.1	Relación Beneficio – Costo (RB/C e I/C)	56
VI.	COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS	57
VII.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	58
7.1	Conclusiones	58

7.2 Recomendaciones	58
BIBLIOGRAFÍA.....	60
ANEXOS	

ÍNDICE DE CUADRO

CUADRO	PÁGINA
N° 1 Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de la interacción (AxB) en las variables Número de frascos contaminados (NFC), días a la brotación en el laboratorio (DBL) y número de brotes por explantes (NBE).	31
N° 2 Resultado del análisis del efecto principal para evaluar promedios del factor A: Variables, Número de frascos contaminados (NFC), días a la brotación en el laboratorio (DBL) y número de brotes por explantes (NBE)	35
N° 3 Resultados de la prueba de Tukey al 5% para comparar promedios de tratamientos FB de las variables Número de frascos contaminados (NFC), días a la brotación en el laboratorio (DBL) y numero de brotes por explantes (NBE).....	37
N° 4 Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de la interacción (AxB) en las variables Número de hojas por brote (NHB), altura de brotes (AB) y tasa de velocidad de multiplicación (TVM).....	39
N° 5 Resultado del análisis del efecto principal para evaluar promedios del factor A: Variables, Número de hojas por brote (NHB), altura de brotes (AB) y tasa de velocidad de multiplicación (TVM).	43
N° 6 Resultados de la prueba de Tukey al 5% para comparar promedios de tratamientos FB de las variables Número de hojas por brote (NHB), altura de brotes (AB) y tasa de velocidad de multiplicación (TVM)	45

N° 7 Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de la interacción (AxB) en las variables Número de raíz (NR), tamaño de raíz (TR) y volumen de raíz (VR).	47
N° 8 Resultado del análisis del efecto principal para evaluar promedios del factor A: Variables Número de raíz (NR), tamaño de raíz (TR) y volumen de raíz (VR).	51
N° 9 Resultados de la prueba de Tukey al 5% para comparar promedios de tratamientos FB de las variables Número de raíz (NR), tamaño de raíz (TR) y volumen de raíz (VR).	53
N° 10 Costo beneficio	55

GRÁFICO	ÍNDICE DE GRÁFICO	PÁGINA
N° 1 Promedio de los tratamientos AxB de la variable número de frascos contaminados (NFC).....		32
N° 2 Promedio de los tratamientos AxB de la variable días a la brotación en laboratorio (DBL).		33
N° 3 Promedio de los tratamientos AxB de la variable número de brotes por explantes (NBE).		34
N° 4 Tipo de reguladores de crecimiento en las variables Número de frascos contaminados (NFC), días a la brotación en el laboratorio (DBL) y número de brotes por explantes (NBE).....		36
N° 5 Dosis de citoquininas en las variables Número de frascos contaminados (NFC), días a la brotación en el laboratorio (DBL) y número de brotes por explantes.(NBE).....		38
N° 6 Promedio de los tratamientos AxB de la variable número de brotes por hojas (NBH).		40
N° 7 Promedio de los tratamientos AxB de la variable altura de brotes (AB).		41
N° 8 Promedio de los tratamientos AxB de la variable tasa de velocidad de multiplicación (TVM).		42
N° 9 Tipo de reguladores de crecimiento en las variables número de hojas por brote (NHB), altura de brotes (AB) y tasa de velocidad de multiplicación (TVM).		44

N° 10 Dosis de citoquininas en las variables Número de hojas por brotes (NHB), altura de brotes (AB), tasa de velocidad de multiplicación (TVM).	46
N° 11 Promedio de los tratamientos AxB de la variable número de raíces (NR).....	48
N° 12 Promedio de los tratamientos AxB de la variable tamaño de raíz (TR)	49
N° 13 Promedio de los tratamientos AxB de la variable volumen de raíz (VR)	50
N° 14 Tipo de reguladores de crecimiento en las variables número de raíz (NR), tamaño de raíz (TR) y volumen de raíz (VR)	52
N° 15 Dosis de citoquininas en las variables Número de raíces (NR), tamaño de raíz (TR) y volumen de raíz (VR).....	54

ÍNDICE DE ANEXO

ANEXO	PÁGINA
N° 1 Ubicación de la investigación.....	67
N° 2 Cronograma de actividades	68
N° 3 Presupuesto estimado del ensayo	71
N° 4 Glosario técnico	74

RESUMEN Y SUMMARY

RESUMEN

Una de las berries con mayor demanda en el mercado mundial es la frambuesa, un cultivo cuyo fruto se caracteriza por sus excelentes características nutraceuticas. En los últimos 5 años su producción ha aumentado aproximadamente en 80 mil toneladas a nivel mundial. El tema de investigación planteado es la Evaluación de plántulas de frambuesa (*Rubus idaeus. L*) propagadas mediante la multiplicación in vitro, utilizando tres tipos de citoquininas en cuatro dosis en Laguacoto III, cantón Guaranda provincia de Bolívar. Los objetivos fueron: 1. Determinar el tipo de citoquinina que ayuda a la mayor multiplicación de plántulas de frambuesa. 2. Identificar la dosis de citoquinina que ayuda a un mayor desarrollo de las plántulas. 3. Establecer la relación beneficio costo en cada uno de los tratamientos.

La metodología aplicada fue un diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones. Se tuvo doce tratamientos con dos factores; FA: tipos de citoquininas (benzil adenina, benzil aminopurina y kinetina) y FB: (0-2-4-6 mg). Se realizó un análisis de varianza, prueba de Tukey al 5% para comparar los promedios entre tratamientos. Análisis económico de la relación beneficio costo.

Dentro de las variables a evaluar se determinó el número de brotes por explantes donde el mejor tratamiento fue el T12 (Kinetina 6 mg) con un promedio de 9 brotes por explantes. Así mismo se analizó el beneficio costo donde el mejor tratamiento fue el T12 (Kinetina 6 mg) que por cada dólar invertido se obtiene de ganancia \$3.51.

Palabras clave: Frambuesa, propagación in vitro, citoquininas, kinetina

SUMMARY

One of the berries with the highest demand in the world market is the raspberry, a crop whose fruit is characterized by its excellent nutraceutical characteristics. In the last 5 years its production has increased approximately 80 thousand tons worldwide. The research topic is the evaluation of raspberry (*Rubus idaeus* L) seedlings propagated by in vitro multiplication, using three types of cytokinins in four doses in Laguacoto III, Guaranda canton, province of Bolivar. The objectives were: 1. To determine the type of cytokinin that helps the multiplication of raspberry seedlings. 2. To identify the dose of cytokinin that helps seedling development. 3. Establish the cost-benefit ratio for each of the treatments.

The methodology applied was a randomized complete block experimental design with three replications. There were twelve treatments with two factors; FA: types of cytokinins (benzyl adenine, benzyl aminopurine and kinetin) and FB: (0-2-4-6 mg). An analysis of variance, Tukey's test at 5% was performed to compare the averages between treatments. Economic analysis of the benefit-cost ratio.

Among the variables to be evaluated was the number of shoots per explant, where the best treatment was T12 (Kinetin 6 mg) with an average of 9 shoots per explant. The cost benefit was also analyzed, where the best treatment was T12 (Kinetin 6 mg), with a profit of \$3.51 for each dollar invested.

Key words: Raspberry, in vitro propagation, cytokinins, kinetina

I. INTRODUCCIÓN

El género ***Rubus*** pertenece a la familia Rosácea, es uno de los más diversos y de amplia distribución geográfica, presenta una gran diversidad morfológica y genética; comprende un gran número de especies silvestres además de las que se cultivan domesticadas por sus frutos comestibles (Salazar *et al.*, 2007). El consumo de frutos de este género ha tenido gran aceptación en años recientes por su elevado poder antioxidante y su relación con la salud (Seeram *et al.*, 2006)

Una de las berries con mayor demanda en el mercado mundial es la frambuesa, un cultivo cuyo fruto se identifica por sus excelentes características nutraceuticas. En los últimos 5 años su producción ha incrementado aproximadamente en 80 mil toneladas a nivel mundial. Países como: Estados Unidos, Canadá y Chile son grandes exportadores de este fruto, su precio oscila entre los 5\$ y los 15\$. Para entender la demanda de esta fruta es necesario realizar una investigación de micropropagación, que es una opción para acelerar la producción masiva, incluyendo su proceso agronómico. (INTAGRI, 2017)

En el Ecuador, la frambuesa era poco conocida hasta el año de 1.980 aproximadamente, ya que tradicionalmente se ha sembrado mora de castilla para el consumo local. A finales de los años 80 se introdujeron de Norte América variedades de frambuesa que obtuvieron una buena adaptación y hasta los años 2.002, 2.003 se la produjo con fines de exportación. En los últimos años esto ha cambiado ya que existe en el país un segmento de mercado que si consume frambuesa como fruta fresca y en cantidades considerables; no solo se consume en cantidades importantes, sino que también de modo regular. Ahora el consumo de frambuesa en el país ha crecido, conociendo que en promedio se consumen 1,5 kilos de frambuesa por cada familia de recursos medios, medios-altos o altos. Esta demanda es apenas abastecida por frambuesa que viene importada desde Chile. (Manzano, M, 2013). Según datos

estadísticos del 2.005, se tiene que Ecuador importa en torno a de 10 toneladas de frambuesas y otras bayas. Se estima un valor de aproximadamente de 2.430 dólares (\$) por tonelada. Hasta el año 2.004 había registros en el Ecuador de una superficie cosechada de frambuesa y otras bayas de alrededor de 2.250 hectáreas, con una producción a nivel nacional de 3.920 toneladas y un rendimiento por hectárea de 1,74 toneladas (CORPEI, 2018)

En la provincia de Bolívar actualmente no se tiene información sobre el cultivo siendo una limitante al momento de fortalecer el cultivo con miras a futuro, es así que el presente estudio contribuye con información, sobre la multiplicación in vitro de plántulas de frambuesa. El término cultivo de tejidos tiene relación al desarrollo de células vegetales bajo condiciones in vitro, dichas células se cultivan asépticamente en un medio de cultivo de composición química definida y se incuban bajo condiciones ambientales controladas; englobando a un heterogéneo grupo de técnicas para llevar a cabo tal fin. (Ruiz *et al.*, 2018)

Las citoquininas son las encargadas de interrumpir la dominancia apical, promover la inducción y proliferación de las yemas axilares in vitro, siendo importante conocer las concentraciones y el tipo de citoquinina que debe utilizarse dependiendo cada caso, estos son los factores que influyen en el éxito de la micropropagación in vitro, especialmente en el género *Vaccinium* (Erig, A., 2006).

Los objetivos establecidos en esta investigación fueron:

- Determinar el tipo de las citoquininas que ayuda a la mayor multiplicación de las plántulas de frambuesa.
- Identificar la dosis de citoquinina que ayuda a un mayor desarrollo de las plántulas.
- Establecer la relación beneficio costo en cada uno de los tratamientos.

II. PROBLEMA

Debido a la falta de plantas certificadas en el país, es necesario buscar alternativas que permitan multiplicar las plantas de frambuesa libres de patógenos, por lo que el uso del cultivo in vitro se considera una herramienta para la obtención de plantas de alta calidad. En Ecuador se han realizado algunos intentos de microcrianza y se han reportado avances considerables en la tecnología, pero aún no se han obtenido los resultados esperados.

Aunque la fruta contiene una gran cantidad de semillas, muchas de ellas no pueden sobrevivir y la tasa de germinación en la naturaleza es muy baja. Al probar la reproducción asexual de forma tradicional, debido a la alta contaminación que ocasiona la introducción de materiales silvestres, es difícil establecerla debido a la pequeña cantidad de frambuesas en el mercado local.

Existen algunos viveristas en el callejón interandino que han intentado multiplicar este noble frutal por diversos métodos ya sea sexuales y asexuales, sin obtener resultados positivos que favorezcan a la multiplicación de la misma, sin embargo, existen algunas zonas agroecológicas donde los fruticultores demandan de estas plantas para poder diversificar su producción frutícola. Debido a que existe demanda tanto en los mercados locales, nacionales e internacionales.

Si este tipo de investigaciones no se realiza en estos frutales que son no tradicionales o exóticos, no tendrán nuevas alternativas de producción frutícola tanto en la provincia como a nivel nacional, especialmente en la provincia de Bolívar, que en un alto porcentaje de sus agricultores se dedican al monocultivo (maíz) con bajos ingresos económicos que en muchas de las veces no recuperan el capital invertido; si consideramos que en la provincia de Bolívar existen diversidad de zonas agroecológicas donde se pueden emprender con los huertos del frutal mencionado, donde

tendrán una mayor rentabilidad y por ende podrán mejorar su calidad de vida evitando que los productores migren a los centros poblados o muchas de las veces fuera del país.

La presente investigación se enfoca en desarrollar una metodología de actualidad como es la multiplicación in vitro utilizando tres tipos de citoquininas en cuatro dosis y mejorar la calidad de plantas para poder ofertar a los diferentes productores de la región lo que permitirá formar huertos de frambuesa con plantas de calidad por ende facilitará un mayor desarrollo en menor tiempo al igual que el inicio de su producción. Beneficiándose los investigadores, los estudiantes los mismos que tendrán un documento de fuente de investigación, técnicos que están involucrados con este cultivo y sobre todo los fruticultores.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Origen

El género *Rubus* es el género de mayor número de especies dentro de la familia *Rosaceae*, estimado entre 700 y 750 especies distribuidas en 12 subgéneros a nivel mundial muchas de ellas se cultivan por su fruto, mientras que otras son más de uso ornamental (Robles, E, 2009)

3.2 Taxonomía

La clasificación taxonómica de la especie *Rubus idaeus L.* frambuesa roja es la siguiente:

Género	Rubus
Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
Infrareino	Streptophyta
Superdivisión	Embryophyta
Subdivisión	Spermatophyta
División	Tracheophyta
Clase	Magnoliophyta
Superorden	Rosanae
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae

Fuente: (Sistema de Información de Biodiversidad, 2014)

3.3 Descripción botánica

3.3.1 Sistema radicular

El sistema radicular se localiza en la parte más superficial del suelo, situándose el 80% en los primeros 30 cm. Está compuesto en su mayor parte por raíces finas, y por otras más gruesas y leñosas que sirven de

soporte a la planta. Sobre estas últimas se forman yemas adventicias de las que brotan nuevos brotes todos los años, asegurando la producción regular del cultivo (García et al., 2014)

3.3.2 Tallo

El frambueso presenta un tallo subterráneo y corto, por el que emite estolones medianamente fuertes y abundantes en número, según la variedad (INFOAGRO, 2015)

3.3.3 Hojas

Son alternas, compuestas, estipuladas, formadas por cinco a siete folíolos, aunque presenta de tres a cinco. Estos folíolos son ovales, doblemente aserrados, de color verde en el haz el cual posee nervaduras muy marcadas, y ligeramente blanquecino a gris en el envés, el cual posee abundante vello y e incluso ligeras espinas (Morales, C, 2009)

3.3.4 Flores

Se agrupan en panículas y son muy atractivas y apetecibles para las abejas ya que además de polen, producen mucho néctar. Son flores pequeñas, hemafroditas, poseen un cáliz formado por cinco sépalos verdes de vello variable, una corola de cinco pétalos de color blanco (García et al., 2014)

3.3.5 Fruto

Está formado por numerosas drupas agregadas entre sí, formando una polidrupa en torno a un receptáculo, del que se desprende en la maduración. La inmensa mayoría de las variedades cultivadas producen frutos de color rojo aunque también existen algunos de color amarillo, púrpuro o negro (Bañados, P, 2002)

3.4 Requerimientos edafoclimáticos

3.4.1 Altitud

Mayor de 2000 m. Si se cultiva en regiones más bajas, se recomienda utilizar cultivares de bajo requerimiento de frío y la aplicación de compensadores de frío y hormonas de crecimiento (Rodríguez, A, 1984)

3.4.2 Precipitación y humedad relativa

Se puede cultivar con precipitaciones acumuladas de 300 a 1700 mm, durante el ciclo de desarrollo, siendo el óptimo 1000 mm (FAO, 1994). Con humedad relativa prefiere una atmósfera seca (Santibáñez, 1994)

3.4.3 Temperatura

Es una especie de gran tolerancia a las heladas invernales El crecimiento se propicia a temperaturas entre 5 y 26°C, siendo el óptimo 20°C (FAO, 1994)

3.4.4 Clima

Es una especie característica de zonas de media montaña que tiene particularidad por los ambientes frescos, le conviene lugares ventilados y con alta humedad relativa. No es muy exigente en horas frío invernales necesitando anualmente un mínimo de 700 horas-frío (PortalFruticultura.com, 2019)

3.4.5 Suelo

Precisa de suelos permeables, aireados, frescos, con buen contenido en materia orgánica, preferible exentos de caliza activa y pH ligeramente ácido. Los más óptimos son suelos franco-arenosos, con una profundidad mínima de 30 cm y con buena disponibilidad de agua durante el verano (PortalFruticultura.com, 2019)

3.5 Variedades

Hay dos tipos de variedades de frambuesa: reflorcientes (remontantes) y no reflorcientes. Las reflorcientes producen dos cosechas anuales ya que en su primera cosecha en la parte apical de la caña (tallo) y la segunda se produce en las yemas, además necesitan menos horas frío. En cambio, las variedades no reflorcientes crecen el primer año y fructifican hasta el siguiente, y por lo general demandan soporte en V y poda después de la cosecha, además toleran la poda química. Las primeras tienen un rendimiento promedio entre 15 a 20 t/ha y su periodo de plena producción se da en la segunda cosecha, mientras que las segundas tienen un rendimiento promedio de 10 a 20 t/ha y su periodo de plena producción es en el segundo año. Las variedades reflorcientes más generalmente usadas son: Heritage, Summit, Autumn bliss, Polka, Sugana, Regina, Adelita y Kwanza. Las variedades comunes no reflorcientes son: Meerker, Glen Lyon, Glen Prosen, Malling Explot, Gradina, Tulameen y Tadmon (INTAGRI, 2017)

3.6 Sistema de propagación

3.6.1 Sistema tradicional de propagación de frambuesa

El sistema tradicional de propagación de frambueso consiste en el establecimiento de un vivero en campo, utilizando distancias menores (1,2 a 1,5 m entre hileras) que las usadas en un huerto comercial, del cual se pueden obtener cañas de un año de edad para ser plantadas durante el invierno o bien brotes de menos de un año, que pueden establecerse en primavera (INIA, 2009)

3.6.2 Sistema mejorado

El sistema más recomendado de propagación de frambueso es la producción de plantas a partir de brotes etiolados. Las principales ventajas de este sistema son la facilidad para eliminar problemas sanitarios y el corto

periodo de tiempo que se requiere para obtener las nuevas plantas. Debe iniciarse a partir de plantas madres de buena calidad, ojala provenientes de cultivo in vitro, que asegure que están libres de virus, de donde se obtendrán las raíces para iniciar la propagación (INIA, 2009)

3.7 Micropropagación

La micro propagación fundamenta en tomar pequeñas secciones del tejido de una planta o estructuras enteras, como yemas, y cultivarlas en condiciones artificiales para regenerar plantas completas. La micropropagación es esencialmente útil para conservar plantas valiosas, mejorar especies en aquellos casos en que es difícil hacerlo por otros medios (como sucede con muchos árboles), acelerar el mejoramiento de plantas y obtener abundante material vegetal para la investigación (ChileBio, 2018)

3.7.1 Etapa de la propagación in vitro

- Fase 0: Preparación de la planta madre

Para poder formar el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para lograr estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para admitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Castillo, A, 2015)

Esta fase fue pensada para tratar de reducir los problemas de contaminación que se presentaban comúnmente en la fase I. Sin embargo, en la actualidad existe un consentimiento que esta etapa es importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de trabajo eficiente y

repetible, por lo que cada vez se le va prestando mayor atención. Tiene una evidente influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso desde el punto de vista sanitario, fisiológico y genético (Villalobos, V; Thorpe, T, 1991) En esta fase es necesario tener en cuenta:

Selección de las plantas donantes: El inicio de todo proceso de cultivo de tejidos sólo tiene sentido cuando se emplea un material de partida adecuado. La complejión genética de la planta donante es el primer factor a evaluar. Para la mayoría de las plantas propagadas in vitro, el material inicial es una planta élite seleccionada por rasgos fenotípicas especiales (Villalobos, V; Thorpe, T, 1991)

- Estado fisiológico de la planta donante

Es de gran influencia en la respuesta de los tejidos en cultivo, reportándose diferencias en los requerimientos nutricionales y hormonales cuando los tejidos proceden de plantas con diferente edad fisiológica. Generalmente, se manejan plantas en estado de crecimiento activo: vigoroso y sano (Villalobos, V; Thorpe, T, 1991)

- **Fase 1: Desinfección del material vegetal**

Una vez elegida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se adquirirán los explantes. Los explantes pueden ser entre yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. Antes de extraer los explantes se realizará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Los contaminantes más frecuentes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe conservar en condiciones de asepsia. A efectos de lograr las condiciones de asepsia, se trabajará en cabinas de flujo laminar para extraer los explantes a partir del material vegetal. Estos explantes se introducirán en un tubo de cultivo conteniendo medio de iniciación para poder controlar la sanidad y la viabilidad, luego de efectuar la desinfección del material con hipoclorito de

sodio (agua clorada comercial), pura o diluída durante un período de 5 a 15 minutos, seguido por 3 a 4 enjuagues en agua esterilizada. Introducirán en un tubo de cultivo conteniendo medio de iniciación para poder controlar la sanidad y la viabilidad, luego de cumplir la desinfección del material con hipoclorito de sodio (agua clorada comercial), pura o diluída durante un período de 5 a 15 minutos, seguido por 3 a 4 enjuagues en agua esterilizada.

- **Fase 2: introducción del material in vitro**

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas obedeciendo al material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, empieza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo in vitro (Castillo, A, 2015)

La introducción de los materiales para la iniciación del proceso de conservación se hace generalmente de tres formas:

- A partir de material vegetativo (estacas): proveniente de centros experimentales o colectas realizadas en el país anfitrión.
- En forma in vitro: proveniente de países donantes.
- En forma de semilla botánica y posterior rescate de embriones, específicamente para las especies silvestres (Gracia M., et al 2010)

- **Fase 3: Multiplicación de los brotes**

Durante esta fase se augura que los explantes que sobrevivieron la FASE 1 y 2 originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará inmediatamente de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se ejecutan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado

que permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas. El número de plantas que se logra dependiendo de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación accede alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados (Castillo, A, 2015)

Los explantes sanos y libres de contaminantes se dividirán y se transferirán al medio de multiplicación MS, suplementados con concentraciones de (GA3) y (BAP) y 30% de sacarosa (Cancino, G., et al 2015)

- **Fase 4: Elección de un medio de enraizamiento de los explantos**

Para enraizar los explantes se manipulan principalmente plantines individuales de un tamaño aproximado de 2 centímetros. Los brotes conseguidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no requieren pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea (Castillo, A, 2015)

En esta etapa se origina la formación de raíces adventicias. En las especies herbáceas es relativamente fácil mientras que en muchas especies leñosas más complicada por su limitada capacidad rizogénica. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones in vitro como ex vitro. En el primer caso pueden utilizarse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (principalmente auxinas) para promover la rizogénesis. Los sustratos contienen: medio solidificado con agar, perlita y/o vermiculitas humedecidas con medio nutritivo o agua. En un medio solidificado con agar, los nutrientes se comprimen de $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{4}$ de la composición original, y la sacarosa se reduce a una concentración final de 1-2%. Medios con baja

concentración salina, como el aumentan el porcentaje de enraizamiento de vástagos axilares en plantas latifoliadas (Olmos, S. *et al* 2015)

- **Fase 5: Aclimatación de los explantos enraizados**

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso obedecen a la aclimatación. En esta etapa las plantas tolerarán cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales. En el momento en que se extraen los explantes o plantines enraizados de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernáculo, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y habitualmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para impedir la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta.

3.7.2 Medio de cultivo

Los medios nutritivos para el cultivo de células y tejidos vegetales son, en general, menos complejos que los de cultivos microbianos y son formulados de manera más o menos empírica. Si bien se desarrollan periódicamente nuevas fórmulas comerciales, no existe hasta el presente un diseño racional que tenga en cuenta la composición centesimal de la célula vegetal y el conjunto de condiciones que registran el crecimiento y la diferenciación. No obstante, normalmente se puede utilizar un medio sencillo y complementarlo con diferentes componentes y reguladores de crecimiento para llegar empíricamente a la fórmula que le brinde al tejido las excelentes condiciones para su crecimiento y producción. Se ha detallado un gran

número de medios nutritivos para el cultivo de vegetales in vitro. Estos medios de cultivo consignan de sales minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento (Llorente, B, 2002)

3.7.3 Medio de cultivo Sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) en (mg/lit)

- $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ 1.650
- KNO_3 1.900
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.440
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.370
- KH_2PO_4 0.170
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0278
- $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0372
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0169
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0086
- H_3BO_3 0.0062
- KI 0.00083
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.00025
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.000025
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.000025
- Mioinositol 0.100
- Tiamina HCl 0.0001
- Ácido nicotínico 0.0005
- Piridoxina HCl 0.0005
- Glicina 0.002

3.7.4 Micronutrientes en mg/lit

- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27,8
- Na_2EDTA 37,3
- H_3BO_3 6,2
- $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22,3

- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8 , 6
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,025
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,025
- KI 0,83

3.7.5 Vitaminas en mg/lt

- myo- Inositol 100
- Tiamina HCl 0,1
- Ácido nicotínico 0,5
- Glicina 2, 0
- Piridoxina HCl 0,5

3.7.6 Elaboración de soluciones madre del medio de cultivo murashige y skoog

Para la producción del medio de cultivo “MS” se hace las siguientes:

- Stock de macronutrientes
- Stock de micronutrientes
- Stock de quelatos de hierro (Fe)
- Soluciones Stock de vitaminas
- Soluciones Stock de Reguladores (Damasco, L., 2020)

3.7.7 Reguladores de crecimiento

Son compuestos que se sintetizan naturalmente dentro del tejido de la planta, es decir endógenamente y cumplen un rol regulatorio más que nutricional en el crecimiento y desarrollo. Estos compuestos generalmente activos a muy bajas concentraciones, son conocidos como sustancias de crecimiento, fitohormonas u hormonas vegetales. Químicos sintéticos con similar actividad fisiológica para modificar el crecimiento y desarrollo de la

planta son denominados también como reguladores de crecimiento (CENTA, 2015)

3.7.8 Citoquininas

Son compuestos que también intervienen como sustancias de desarrollo. Son muy importantes para la regulación de crecimiento y morfogénesis en cultivo de tejidos. En las plantas las raíces son el principal centro para la biosíntesis de Citoquininas de allí son traslocadas hacia los brotes y hojas, tienen movimiento acropétalo (ascendente), tienen efecto en la citocinesis o división celular, de allí el nombre de Citoquininas, interactúan con auxinas en la formación de órganos como la floración; retarda la senescencia, rompe la dominancia apical estimulando el desarrollo de tallos laterales y en el movimiento de nutrientes. Son constituyentes del ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) y de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y tienen interacción sinérgica con las auxinas. Cuando la proporción Citoquinina/auxina es alta favorece la formación de tallos y si es baja favorece la formación de raíces (Chamorro, A., et al 2007)

Dentro de la Citoquininas más utilizadas tenemos

- Kinetina (KIN)
- Benzil aminopurina (BAP)
- 2-isopentil adenina (2ip) (Chamorro, A., et al 2007)

3.8 Plagas y enfermedades del cultivo de frambuesa

3.8.1 Plagas

Plantas Facilicimo (2018) Menciona las siguientes plagas como las más comunes en el frambueso:

- **Pulgones**

Los pulgones hay de muchos colores, verdes, negros, amarillo pero si ves unos de color marrón dorado, quiere decir que están parasitados por avispa, conviene dejar para que estas acaben con ellos.

- **Ácaros**

La araña roja o de 2 puntos y la araña roja de los frutales (*Panocicus ulmi*) pueden afectar a nuestro frambueso.

- **Escarabajo Ocre del Frambueso**

Las larvas de escarabajos ocre se nutren de una hierba adventicia llamada como San Benito (*Geum urbanum*), pero los adultos de las flores del frambueso, incitando grandes pérdidas en el cultivo, es por ello que debemos controlar esta planta para evitar que se establezca la plaga en el cultivo.

- **Mosca blanca**

La mosca blanca es inmune a todos los tipos de tratamientos incluidos los químicos, biológicos, mecánicos y otros por eso es mejor el tratamiento preventivo a tiempo.

3.8.2 Enfermedades

Plantas Facilicimo (2018) menciona las siguientes enfermedades como las más comunes en el frambueso:

- **Botrytis**

La botrytis suele presentarse en condiciones en exceso de humedad en el ambiente y la planta ha recibido algún daño físico ya sea por alguna plaga, viento o por haber granizado. Esto induce heridas por donde puede penetrar el hongo.

- **La roya**

La Roya es otra enfermedad provocada por un hongo y se caracteriza porque las manchas que provoca en la hoja son de un color anaranjado.

- **Oídio**

El temido oídio afecta también al cultivo de frambuesa, por eso debemos evitar mojar las hojas de la planta cuando realicemos la labor de riego.

IV. MARCO METODOLÓGICO

4.1 Materiales

4.1.1 Ubicación de investigación

Provincia	Bolívar
Cantón	Guaranda
Parroquia	Gabriel Ignacio Veintimilla
Sector	Granja Laguacoto III (Laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente)

4.1.2 Situación geográfica y climática

Altitud	2.608 msnm
Latitud	01°36' 51.63'' S
Longitud	78°59' 54.49'' W
Temperatura máxima	21°C
Temperatura mínima	7°C
Temperatura media	14.4°C
Heliofanía	900 horas/luz/año
Pluviometría promedio anual	980ml
Humedad relativa promedio anual	70%

Fuente: (PDOT BOLÍVAR, 2012)

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 Materiales experimentales

Yemas apicales de Frambuesa de edad aproximada de un año (*Rubus idaeus. L*)

4.1.5 Materiales de campo

- Cámara digital
- Libro de campo
- Esferos
- Tijeras de podar
- Navaja de podar victorino
- Botas de caucho
- Jabón liquido

4.1.6 Materiales de laboratorio

- Cabina de flujo laminar horizontal
- Refrigerador domestico
- Autoclave
- Vidriería
- Balanza digital
- Microondas
- Agitador magnético
- Frascos de cristal
- Agua destilada
- Papel absorbente
- Franelas
- Bandeja de plástico
- Estantería
- Gorro
- Mascarilla
- Guantes
- Gafas

- Pinzas
- Bisturí
- Mechero de Alcohol 70 °
- Alcohol de 70 °
- Libreta
- Esfero
- Gel desinfectante
- Jabón líquido
- Regla
- Soluciones nutritivas
- Stock #1
- Nitrato de potasio
- Nitrato de amonio
- Cloruro de calcio
- Sulfato de magnesio
- Fosfato de potasio
- Stock #2
- Sulfato de magnesio
- Sulfato de zinc
- Yoduro de potasio
- Molibdato de sodio
- Stock #3
- Sulfato ferroso
- Na EDTA
- Vitaminas
- Myoinositol
- Acido nicotínico
- Piridoxima
- Tiamina
- Reguladores de crecimiento

- Benzil adenina
- Kinetina
- Benzil aminopurina
- Agar agar
- Sacarosa

4.1.7 Materiales de oficina

- Computadora
- Impresora
- Disco extraíble
- Flash memory
- Hojas de papel bond A4
- Esfero
- Calculadora

4.2 Métodos

4.2.1 Factores en estudio

Factor A (Tipos de citoquininas)

- A₁: Benzil adenina
- A₂: Benzil aminopurina
- A₃: Kinetina

Factor B (Dosis de citoquininas)

- B₁: 0 mg/lit (testigo absoluto)
- B₂: 2 mg/lit
- B₃: 4 mg/lit
- B₄: 6 mg/lit

4.2.2 Tratamientos

Para el presente proyecto, se utilizó las siguientes combinaciones de los factores AxB; 12 tratamientos según el detalle:

Tratamientos N°	Código	Detalle
T1	A1B1	Benzil adenina + 0 mg/lt (testigo)
T2	A1B2	Benzil adenina + 2 mg/lt
T3	A1B3	Benzil adenina + 4 mg/lt
T4	A1B4	Benzil adenina + 6 mg/lt
T5	A2B1	Benzil aminopurina + 0 mg/lt (testigo)
T6	A2B2	Benzil aminopurina + 2 mg/lt
T7	A2B3	Benzil aminopurina + 4 mg/lt
T8	A2B4	Benzil aminopurina + 6 mg/lt
T9	A3B1	Kinetina + 0 mg/lt (testigo)
T10	A3B2	Kinetina + 2 mg/lt
T11	A3B3	Kinetina + 4 mg/lt
T12	A3B4	Kinetina + 6 mg/lt

4.2.3 Tipo de diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA)

4.2.4 Procedimiento

Localidad	1
Número de tratamientos	12
Número de repeticiones	3
Número de unidades experimentales	36
Número de explantes	108

4.2.5 Tipo de análisis

Análisis de Varianza (ADEVA) según el siguiente detalle:

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CME*
Factor A: Citoquininas (3-1)	2	$\int^2 e + 12 \theta^2$ FA
Factor B: Dosis de Citoquininas (4-1)	3	$\int^2 e + 9 \theta^2$ FB
FA x FB: (A-1) (B-1)	6	$\int^2 e + 3 \theta^2$ FA x FB
Error Experimental t (r-1)	24	$\int^2 e$
Total (t x r) – 1	35	

Cuadrados medios esperados modelo fijo tratamientos seleccionados por los investigadores.

- Prueba de Tukey al 5% para comparar los promedios del factor A.
- Prueba de Tukey al 5% para comparar promedios de los tratamientos en las variables que sean significativas (Fisher protegido).
- Análisis de la relación beneficio/costo.

4.3 Métodos de evaluación y datos tomados

4.3.1 Días a la brotación en laboratorio (DBL)

Los días a la brotación se tomaron en el área de incubación por observación directa a los 60 días en sus respectivos medios de proliferación, se consideró un brote cuando presenten al menos dos hojas desarrolladas.

4.3.2 Número de brotes por explante (NBE)

Se procedió a tomar del área de incubación por observación directa a partir a los 60 días del último subcultivo a sus respectivos medios de proliferación, se consideró un brote al presentar estas al menos dos hojas desarrolladas.

4.3.3 Número de hojas por brote (NHB)

La variable número de hojas por brote se procedió a tomar del área de incubación por observación directa en el frasco de cristal a los 60 días del subcultivo a sus respectivos medios de proliferación, se consideró hojas desarrolladas todas menos la primera y la última, la cual estuviera en desarrollo.

4.3.4 Altura de brotes (AB)

En la altura de brotes se tomó el área de incubación con la ayuda de una regla por la parte exterior del frasco de cristal desde la parte coronal superficial de la base del brote hasta su ápice a los 60 días del subcultivo a sus respectivos medios de proliferación.

4.3.5 Taza de velocidad de multiplicación (TVM)

La taza de velocidad de multiplicación está expresada la relación entre el número de brotes obtenidos al final del ciclo de la multiplicación sobre el tiempo de duración del ciclo.

Este parámetro se analizará con la siguiente fórmula:

$$TVM = \frac{N^{\circ} \text{ de brotes}}{\text{Tiempo (días)}}$$

4.3.6 Número de frascos contaminados (NFC)

Se evaluó por observación directa la presencia de agentes patógenos causados por hongos durante los 60 días que es el tiempo que transcurrió desde la siembra de los brotes. Teniendo en cuenta que un frasco de cristal está contaminado cuando en el medio de cultivo se observó la presencia de esporas blanquecinas o grises, las cuales con el transcurso del tiempo se diseminan formando una estructura algodonosa, los datos fueron expresados en porcentaje.

4.3.7 Número de Raíces (NR)

Se determinó esta variable contando los días transcurridos desde la aparición de las primeras raicillas de los brotes, efectuando un conteo directo.

4.3.8 Tamaño de Raíz (TR)

El tamaño de raíz que se registró con la ayuda de una regla en frascos tomadas de cada tratamiento y repetición, esto se realizó desde el cuello de la raíz hasta la cofia de la raíz principal, sus resultados están expresados en cm.

4.3.9 Volumen de Raíz (VR)

Esta variable se determinó con la ayuda de una probeta aforada con 20 cm³ de agua, y por diferencia reflejara el volumen de raíz.

4.4 Manejo del experimento

4.4.1 Selección de las plantas

Se obtuvieron los brotes de las plantas de frambuesa provenientes del Cantón Pelileo, provincia Tungurahua, las cuales entraron en un proceso de ambientación en el invernadero de biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente de la "UEB", con el objetivo de eliminar enfermedades en el caso que se presentaran se aplicará Carbendazim de 2.5 gr/l.

4.4.2 Recolección de muestras

Cuando se notó la presencia de brotes en las plantas se extrajeron brotes tomando en cuenta las características (basales, medios o terminales) los mismos que fueron recolectados de una longitud aproximada de 1 a 2,5 cm.

Se recolectó varias muestras de frambuesa, una vez localizadas las zonas se colectó tallos jóvenes con segmentos nodales y se tomaron las coordenadas geográficas del lugar de colecta.

4.4.3 Establecimiento del sistema de asepsia

Para mayor seguridad se realizó una desinfección de acuerdo a la metodología planteada por Perez, I (2014), quien manifestó que para disminuir la carga microbiana en el material vegetal se deberá rociar con una solución fungica-bacteriana (agrimicin-captan a 5g/L) y para el traslado se realizó mediante las condiciones adecuadas, en donde se eliminaron las hojas y cortaron los tallos en fragmentos de 4.5cm, con la presencia de las yemas axiliares en estado de crecimiento.

Posteriormente se realizó un lavado con jabón líquido durante 10min desinfectadas durante 15min en yodo (10gotas/L), sumergidas en una solución con Benlate(1g/L) durante 20 min y lavados con agua estéril.

Dentro de la cámara de flujo laminar, los explantes fueron desinfectados en alcohol al 70% durante 10seg, bioper durante 1min, hipoclorito de sodio al 2% del ingrediente activo *1min y lavados en ADE.

Por último se introdujo en un medio MS modificado, sembrando un explante por tubo y los explantes recolectados pasar por un sistema de asepsia para poder establecerlas in vitro.

4.4.4 Preparación del medio de cultivo

En el laboratorio se procedió a la preparación del medio de cultivo según Murashige y Skoog, el mismo que fue de proliferación, a fin de estimular el desarrollo de los brotes en cada explante, en el que se añadieron macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, agar y reguladores de crecimiento Kinetina, Benzil adenina y Benzil aminopurina en tres concentraciones 2mg/l, 4 mg/l y 6 mg/l respectivamente con un pH de 5.6 - 5.7.

SOLUCIONES CONCENTRADAS		MEDIO DE CULTIVO O PROLIFERACIÓN Dosis en 1lt
STOCK #1	1000ml	100ml
Nitrato de potasio (KNO ₃)	19 g	
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	16,5 g	
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	4,4 g	
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	3,7 g	
Fosfato de potasio (K ₂ HPO ₄)	1,7 g	
STOCK #2	500ml	10ml
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	84.5 mg	
Sulfato de zinc (ZnSO ₄)	43,5 mg	
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	31 mg	
Yoduro de potasio (KI)	4,15 mg	
Molibdato de sodio (Na ₂ MoO ₄)	1,5 mg	
STOCK #3	100ml	10ml
Sulfato ferroso (FeSO ₄)	378,0 mg	
Na EDTA	372,0 mg	
VITAMINAS	100ml	10ml
Myoinositol (C ₆ H ₁₂ O ₆)	1,0 g	
Acido nicotínico (C ₆ H ₅ NO ₂)	50,0 mg	
Piridoxima (C ₈ H ₁₁ NO ₃)	50,0 mg	
Tiamina (C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS ⁺)	4,0 mg	
Agar agar		7g
Sacarosa		30g

Para su preparación se realizó el siguiente procedimiento:

- Se colocó en un vaso de precipitación de 1000ml agua destilada una tercera parte del volumen final a preparar.
- Procedimos a pesar 30gr de azúcar, 7gr de agar, en estado sólido.
- Añadimos la sacarosa al momento que preparamos la solución y el agar se colocó en el medio cuando estuvo a 80°C después de introducirlo al microondas.
- Seguido añadiremos el stock #1, stock #2, stock #3, vitaminas y reguladores de crecimiento (Citoquininas), previamente preparados en tres concentraciones 2mg/l, 4 mg/l y 6 mg/l para distribuir en cada medio de proliferación.

4.4.5 Preparación para los reguladores de crecimiento

La preparación las reguladoras de crecimiento se realizaron a una concentración de 1mg/

- Soluciones de IAA de 1mg/ml.
- Solución de GA3 de 1mg/l
- Solución de Kn de 1mg/ml
- Solución de BPA DE1mg/l

Las citoquininas se disolvieron previamente en una pequeña cantidad de HCl 0,5 N. Se puede calentar suavemente para favorecer la disolución y posteriormente se enraíza al volumen deseado (Álvarez, L. 2016)

4.4.6 Esterilización del medio de cultivo

Se procedió a la distribución del medio de cultivo a los frascos de vidrio, 50cc aproximadamente en cada uno los cuales pasaron a un proceso de esterilización en autoclave a 121°C durante 20min. Seguidamente sacamos los frascos del autoclave en una bandeja metálica y lo dejamos enfriar durante 24h en el área de transferencia.

4.4.7 Introducción al medio de cultivo

Se colocó los brotes en un medio de proliferación para su desarrollo, trasladándolos a un lugar aséptico e iluminado con luz artificial “área de incubación” para estimular sus procesos metabólicos normales.

4.4.8 Transferencia del material vegetal

Cuando alcanzó una altura entre 1 a 2,5 cm en el frasco de cristal se procedió a cortar con la ayuda de un bisturí los nuevos brotes y se procedió a cambiar a otro frasco con medio de cultivo para proceder a tomar las diferentes variables.

4.4.9 Fases de multiplicación.

Se seleccionó los brotes que se adaptaron al medio de introducción, los cuales pasaron por un medio de multiplicación MS modificado con adición de 0,75 ppm de Ácido indol Acético (AIA), en el cual permaneció durante 2 meses. En esta fase se evaluó los niveles de Benzil Aminopurina (BPA) en el medio, con sus tratamientos respectivamente.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Número de frascos contaminados (NFC), Días a la brotación en laboratorio (DBL) y Número de brotes por explantes (NBE).

Tratamientos (AxB)

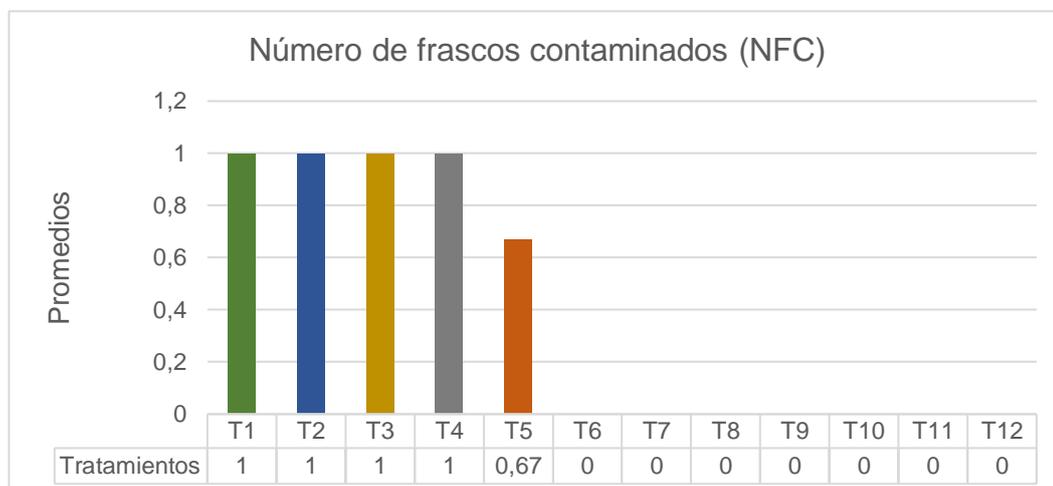
Cuadro N° 1 Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de la interacción (AxB) en las variables Número de frascos contaminados (NFC), días a la brotación en el laboratorio (DBL) y número de brotes por explantes (NBE).

NFC (*)			DBL (*)			NBE (**)		
Trat	Promedios	Rango	Trat	Promedios	Rango	Trat	Promedios	Rango
T1	1,00	A	T6	38,00	A	T12	8,67	A
T2	1,00	A	T7	38,00	A	T10	7,67	AB
T3	1,00	A	T8	36,67	A	T9	7,33	ABC
T4	1,00	A	T11	35,67	A	T11	6,67	ABCD
T5	0,67	A	T10	34,00	A	T7	4,67	BCD
T6	0,00	B	T9	33,00	AB	T8	4,33	CDE
T7	0,00	B	T12	32,33	AB	T6	3,67	DEF
T8	0,00	B	T5	25,67	AB	T1	1,33	EFG
T9	0,00	B	T3	15,00	AB	T5	1,00	FG
T10	0,00	B	T1	14,00	AB	T2	0,00	G
T11	0,00	B	T2	0,00	B	T3	0,00	G
T12	0,00	B	T4	0,00	B	T4	0,00	G
CV= 42,86%			CV= 45,22%			CV= 28,37%		

Promedios con diferente letra, son estadísticamente diferentes al 5%

Fuente: Datos obtenidos del ensayo.

Gráfico N° 1 Promedio de los tratamientos AxB de la variable número de frascos contaminados (NFC).

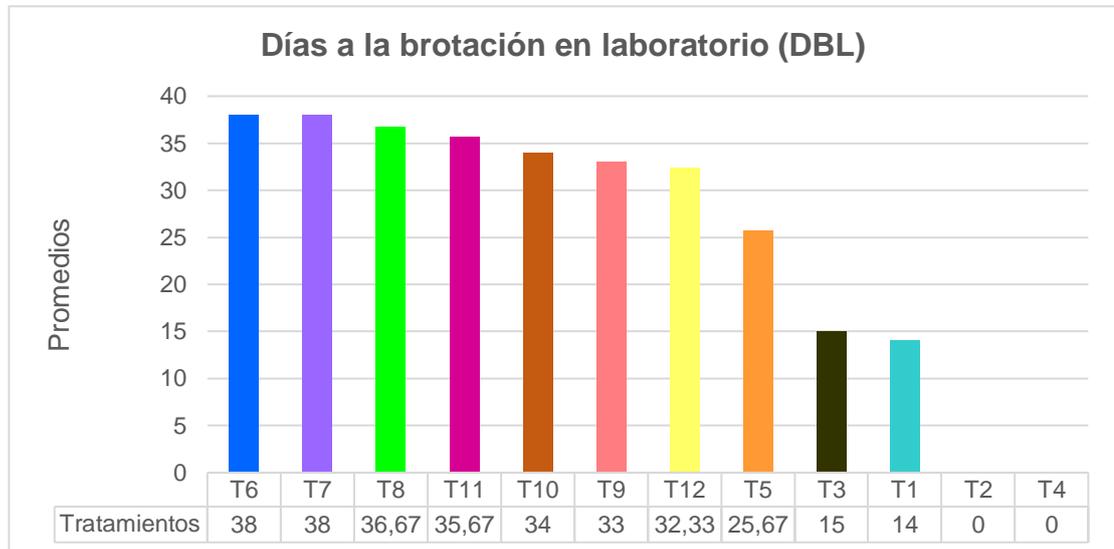


En cuanto a la variable número de frascos contaminados (NFC) evaluados presento una media general de 0,38 y un CV de 42,86%.

De acuerdo con la prueba de Tukey al 5% los tratamientos que demostraron los mayores promedios en cuanto a esta variable fue T1 (Benzil adenina 0 mg), T2 (Benzil adenina 2 mg), T3 (Benzil adenina 4 mg) y T4 (Benzil adenina 6 mg), mientras que los tratamientos con una menor contaminación, se dieron en los tratamientos T6 (Benzil aminopurina 2 mg), T7 (Benzil aminopurina 4mg), T8 (Benzil aminopurina 6 mg), T9 (Kinetina 0 mg), T10 (Kinetina 2 mg), T11 (Kinetina 4 mg) y T12 (Kinetina 6 mg) (Cuadro N°1 y Gráfico N°1)

La contaminación fúngica, pudo deberse a la incorrecta manipulación de los mismos o a los instrumentos contaminados (Molina y Melgar 2014). Se debe mencionar que los frascos pasaron por un proceso de desinfección, donde se cumplió con los pasos respectivos de asepsia que se determina en el protocolo de laboratorio de biotecnología.

Gráfico N° 2 Promedio de los tratamientos AxB de la variable días a la brotación en laboratorio (DBL).

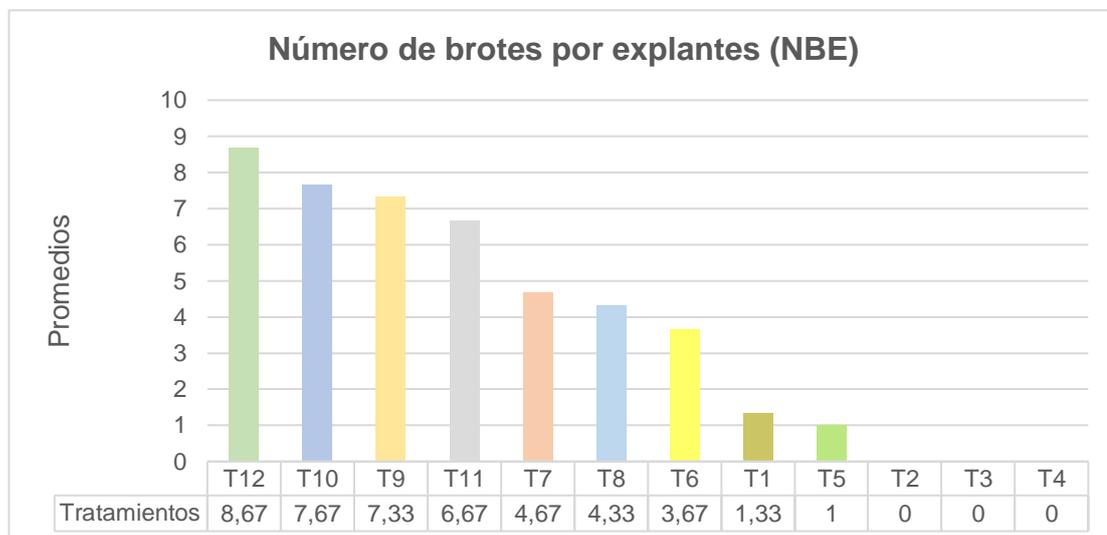


En cuanto a la variable días a la brotación en laboratorio (DBL) se presentó una media general de 25,19 y un CV de 45,22%.

De acuerdo con la prueba de Tukey al 5% el tratamiento que presento mayor tiempo en tener brotación fue el T6 con un promedio de 38 días, lo que quiere decir que en ese intervalo de tiempo no se presentaron presencia de brotes. Mientras que el T14 obtuvo el menor promedio con 14 días a la brotación, existiendo una diferencia de 24 días entre los tratamientos (Cuadro N°1 y Gráfico N°2).

Los días a la brotación en laboratorio 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 en cada uno de los tratamientos.

Gráfico N° 3 Promedio de los tratamientos AxB de la variable número de brotes por explantes (NBE).



En cuanto a la variable número de brotes por explantes (NBE) se presentó una media general de 3,77 y un CV de 28,37%.

De acuerdo con la prueba de Tukey al 5% el tratamiento con mayor promedio a los 60 días, se presentó en el T12 (Kinetina 6 mg) y el T10 (Kinetina 2 mg) de 8,67 y 7,67 respectivamente. Mientras que el menor promedio lo obtuvieron los tratamientos T5 (Benzil aminopurina 0 mg), T2 (Benzil adenina 2 mg) T3 (Benzil aminopurina 4 mg) y T4 (Benzil aminopurina 6 mg).

En cuanto a los brotes por explantes, el empleo de los sistemas in vitro varia dependiendo de la composición del medio de cultivo y del explante seleccionado.

Según Greenway et al., (2012), menciona dentro de su investigación que aun cuando se ha reportado éxitos en propagación in vitro para la frambuesa, el medio con citoquininas, expresan pobre crecimiento y problemas de desarrollo in vitro.

Factor A: Citoquininas

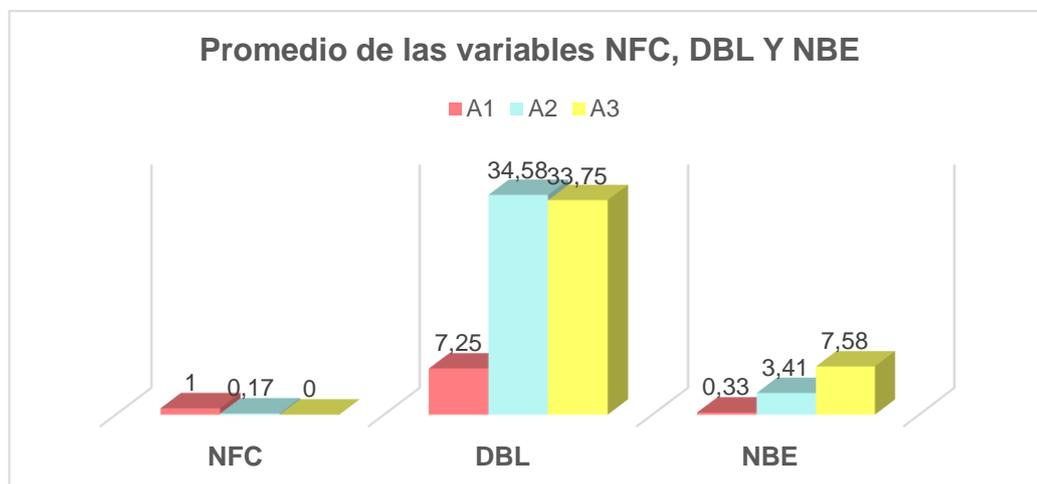
Cuadro N° 2 Resultado del análisis del efecto principal para evaluar promedios del factor A: Variables, Número de frascos contaminados (NFC), días a la brotación en el laboratorio (DBL) y número de brotes por explantes (NBE)

NFC			DBL			NBE		
Factor A: Citoquininas	Promedios	Rango	Factor A: Citoquininas	Promedios	Rango	Factor A: Citoquininas	Promedios	Rango
A1: Benzil adenina	1,00	A	A1: Benzil adenina	7,25	A	A1: Benzil adenina	0,33	A
A2: Benzil aminopurina	0,17	B	A2: Benzil aminopurina	34,58	A	A2: Benzil aminopurina	3,41	B
A3: Kinetina	0,00	B	A3: Kinetina	33,75	B	A3: Kinetina	7,58	C
Efecto principal: A3-A2-A1= 0,83			Efecto principal: A3-A2-A1=8,08			Efecto principal: A3-A2-A1=3,84		

Las letras iguales indican que las diferencias estadísticas no son significativas.

Fuente: Datos obtenidos del ensayo.

Gráfico N° 4 Tipo de reguladores de crecimiento en las variables Número de frascos contaminados (NFC), días a la brotación en el laboratorio (DBL) y número de brotes por explantes (NBE).



El análisis del efecto principal factor A, reguladores de crecimiento; Benzil adenina (A1), Benzil aminopurina (A2) y Kinetina (A3), para la variable número de frascos contaminados la hormona que sobresale es Benzil adenina (A1) con 1% mientras la hormona inferior para esta variable es Kinetina (A3) con 0%. En cuanto la variable días a la brotación la hormona con un mayor porcentaje fue Benzil aminopurina (A2) con 34,58%, mientras que con menor promedio fue la hormona Benzil adenina (A1) con 7,25%. Para la variable número de brotes por explantes la hormona que sobresalió fue la Kinetina (A3) con 7,58%, de lo contrario la hormona con menor promedio fue Benzil adenina (A1) con 0,33%, determinado significancia en las repeticiones (Gráfico N° 4).

En las variables evaluadas dependieron de los cuidados sanitarios dados, así como de la planta madre donde fueron extraídos los explantes.

Factor B: Dosis

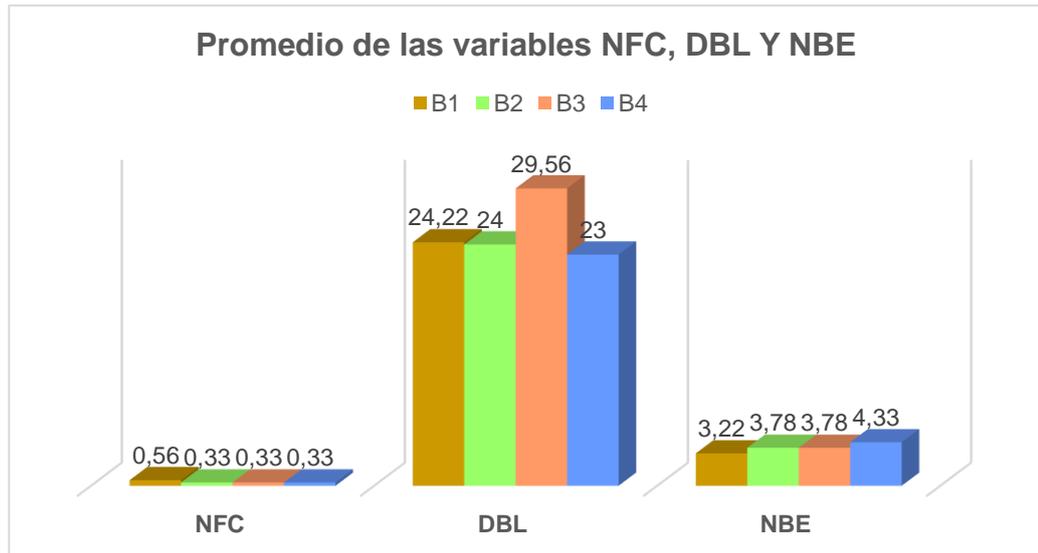
Cuadro N° 3 Resultados de la prueba de Tukey al 5% para comparar promedios de tratamientos FB de las variables Número de frascos contaminados (NFC), días a la brotación en el laboratorio (DBL) y numero de brotes por explantes (NBE)

NFC			DBL			NBE		
Factor B: Dosis	Promedios	Rango	Factor B: Dosis	Promedios	Rango	Factor B: Dosis	Promedios	Rango
B1= 0mg	0,56	A	B1= 0mg	24,22	A	B1= 0mg	3,22	A
B2= 2mg	0,33	B	B2= 2mg	24,00	A	B2= 2mg	3,78	A
B3= 4mg	0,33	B	B3= 4mg	29,56	A	B3= 4mg	3,78	A
B4= 6mg	0,33	B	B4= 6mg	23,00	A	B4= 6mg	4,33	A

Las letras iguales indican que las diferencias estadísticas no son significativas.

Fuente: Datos obtenidos del ensayo

Gráfico N° 5 Dosis de citoquininas en las variables Número de frascos contaminados (NFC), días a la brotación en el laboratorio (DBL) y número de brotes por explantes.(NBE).



En cuanto a la variable número de frascos contaminados se determinó en el testigo (B1 con 0 mg) con 0,56%, mientras que el factor con menos promedio se dio en el B4 con 0,33% se deduce que mientras menos dosis de citoquininas se contaminaron los frascos. Dentro de la variable días de brotación en laboratorio el promedio más alto se dio en el factor B3 con 4 mg con un resultado de 29,56 a diferencia del factor con menos promedio fue B4 con 6 mg con un resultado de 23. En cuanto a la variable número de brotes por explantes el factor con el más alto promedio fue B4 con 4 mg con 4,33 por el contrario el factor con menor promedio fue B1 con 0 mg (testigo) con 3,22, siendo esta variable no significativa al 5%.

Las variables NFC, DBL y NBE dependieron del medio de cultivo en el que se desarrolló.

5.2 Número de hojas por brote (NHB), altura de brotes (AB) y tasa de velocidad de multiplicación (TVM).

Tratamientos (AxB)

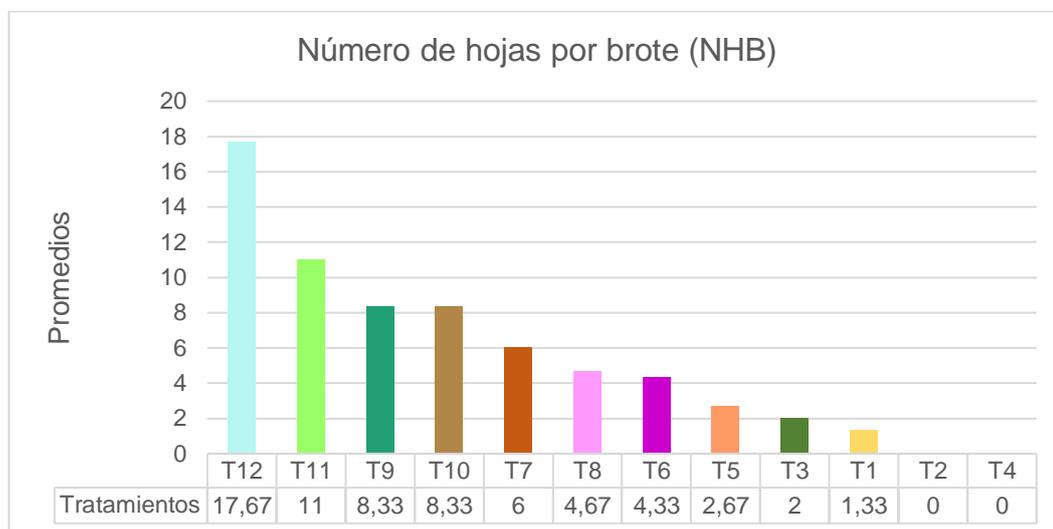
Cuadro N° 4 Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de la interacción (AxB) en las variables Número de hojas por brote (NHB), altura de brotes (AB) y tasa de velocidad de multiplicación (TVM).

NHB (*)			AB (*)			TVM (**)		
Trat	Promedios	Rango	Trat	Promedios	Rango	Trat	Promedios	Rango
T12	17,67	A	T12	1,73	A	T11	1,97	A
T11	11,00	AB	T11	1,67	AB	T12	1,73	A
T9	8,33	ABC	T10	1,50	ABC	T10	1,43	AB
T10	8,33	ABC	T9	1,13	BC	T9	0,87	BC
T7	6,00	BC	T6	1,06	C	T8	0,67	CD
T8	4,67	BC	T8	1,06	C	T7	0,50	CDE
T6	4,33	BC	T7	1,00	C	T6	0,43	CDE
T5	2,67	BC	T5	0,33	D	T5	0,17	DE
T3	2,00	BC	T1	0,00	D	T1	0,00	E
T1	1,33	BC	T2	0,00	D	T2	0,00	E
T2	0,00	C	T3	0,00	D	T3	0,00	E
T4	0,00	C	T4	0,00	D	T4	0,00	E
CV= 65,33%			CV= 25,38%			CV= 30,24%		

Promedios con diferente letra, son estadísticamente diferentes al 5%

Fuente: Datos obtenidos del ensayo.

Gráfico N° 6 Promedio de los tratamientos AxB de la variable número de brotes por hojas (NBH).

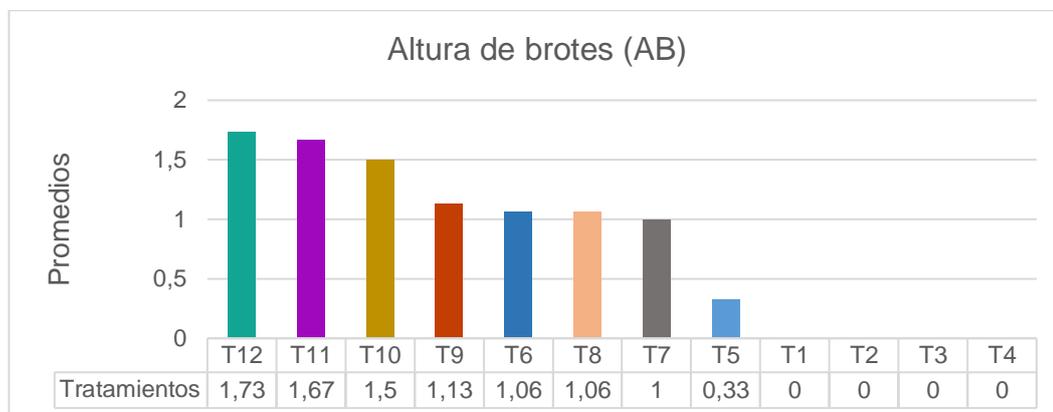


En cuanto a la variable número de hojas por brote (NHB) se presentó una media general de 5,52 y un CV de 65,33%.

De acuerdo con la prueba de Tukey al 5% el tratamiento que presento un promedio mayor en número de hojas por brote a los 60 días es el T12 (Kinetina 6 mg) con 12 hojas, seguido del T11 (Kinetina 4 mg) con 11 hojas. Mientras que el tratamiento con que demostró un menor promedio es el T2 (Benzil adenina 2 mg) y T4 (Benzil adenina 6mg) ambos con 0 brotes, demostrando diferencia significativa entre tratamientos (Cuadro N°4 y Gráfico N°6).

Según Castro, F (2006), en su investigación sobre *Rubus idaeus L* menciona que el tamaño alcanzado por las hojas y los brotes sugiere que una densidad muy alta podría dificultar su desarrollo.

Gráfico N° 7 Promedio de los tratamientos AxB de la variable altura de brotes (AB).



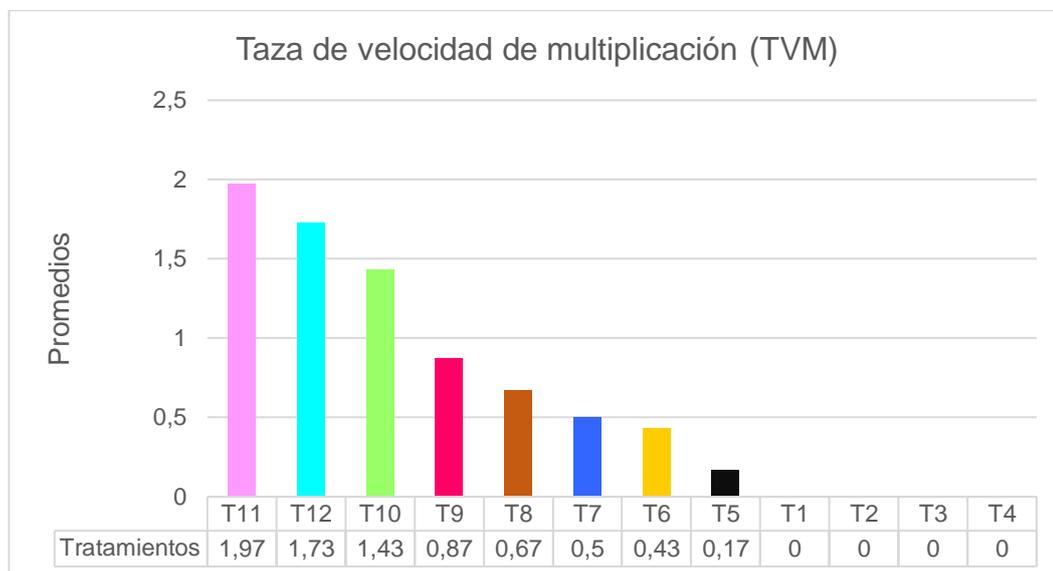
En cuanto a la variable altura de brote (AB) se presentó una media general de 0,79 y un CV de 25,38%.

De acuerdo con la prueba de Tukey al 5% los tratamientos que presentaron mayor promedio fueron los T12 (Kinetina 6 mg) con un promedio de 1,73 cm de altura, seguido el T11 (Kinetina 4 mg) con un promedio de 1,67 cm de altura, mientras que los tratamientos T1 (Benzil adenina 0 mg), T2 (Benzil adenina 2 mg), T3 (Benzil adenina 4 mg) y T4 (Benzil adenina 6 mg) con 0 cm de altura, lo que deduce que la citoquinina con menos efectividad es la Benzil adenina (Cuadro N°4 y Gráfico N°7).

Las respuestas de los tratamientos se asociaron a las distintas concentraciones de elementos específicos, la relación entre diferentes componentes del medio de cultivo o los distintos compuestos orgánicos utilizados.

Nandwani (2015) afirma que para la elongación, son importantes las concentraciones de sales, pero en el medio de cultivo de inducción previo, más que en el medio de cultivo de elongación, haciendo énfasis en el nitrógeno reducido y el calcio como elementos beneficiosos.

Gráfico N° 8 Promedio de los tratamientos AxB de la variable tasa de velocidad de multiplicación (TVM).



En cuanto a la variable tasa de velocidad de multiplicación (TVM) se presentó una media general de 0,65 y un CV de 30,24%.

De acuerdo con la prueba de Tukey al 5% los tratamientos que presentaron mayor promedio fueron los T11 (Kinetina 4 mg) con 1,97 de velocidad de multiplicación y T12 (Kinetina 6 mg) con 1,73 de velocidad de multiplicación. Mientras que por otro lado los tratamientos con que demostraron un menor promedio es el T1 (Benzil adenina 0 mg), T2 (Benzil adenina 2 mg), T3 (Benzil adenina 4 mg) y T4 (Benzil adenina 6 mg) ambos con 0 brotes, demostrando diferencia significativa entre tratamientos (Cuadro N°4 y Gráfico N°8).

Según Tsao (2005) menciona que en su investigación que la presencia de virus como TomRSV (**Tomato Ringspot Nepovirus**), and TSV (**Tobacco Streak Ilarvirus**) en la plántula reduce la tasa de multiplicación in vitro de **Rubus idaeus**.

Factor A: Citoquininas

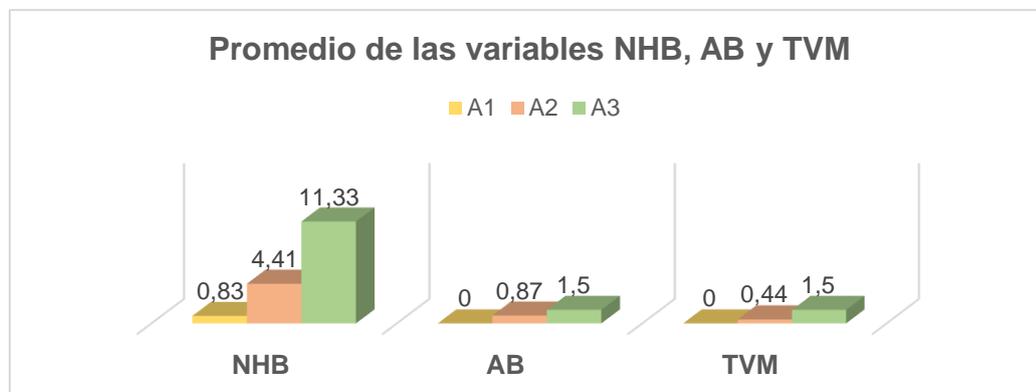
Cuadro N° 5 Resultado del análisis del efecto principal para evaluar promedios del factor A: Variables, Número de hojas por brote (NHB), altura de brotes (AB) y tasa de velocidad de multiplicación (TVM).

NHB			AB			TVM		
Factor A: Citoquininas	Promedios	Rango	Factor A: Citoquininas	Promedios	Rango	Factor A: Citoquininas	Promedios	Rango
A1: Benzil adenina	0,83	A	A1: Benzil adenina	0,00	A	A1: Benzil adenina	0,00	A
A2: Benzil aminopurina	4,41	B	A2: Benzil aminopurina	0,87	B	A2: Benzil aminopurina	0,44	B
A3: Kinetina	11,33	B	A3: Kinetina	1,50	C	A3: Kinetina	1,50	C
Efecto principal: A3-A2-A1= 6,09			Efecto principal: A3-A2-A1= 0,63			Efecto principal: A3-A2-A1= 1,06		

Las letras iguales indican que las diferencias estadísticas no son significativas.

Fuente: Datos obtenidos del ensayo.

Gráfico N° 9 Tipo de reguladores de crecimiento en las variables número de hojas por brote (NHB), altura de brotes (AB) y tasa de velocidad de multiplicación (TVM).



El análisis del efecto principal factor A, reguladores de crecimiento; Benzil adenina (A1), Benzil aminopurina (A2) y Kinetina (A3), para la variable número de hojas por brote existe un gran efecto de la Kinetina con 11,33%, por el otro lado la hormona con menor promedio es el Benzil adenina con 0,83%. En cuanto la variable altura de brotes la hormona con mayor influencia es la Kinetina con 1,5% por lo contrario la hormona con menor influencia es la Benzil adenina con 0%.

Para la variable tasa de velocidad de multiplicación la hormona que sobresalio es la kinetina con 1,5% de lo opuesto la hormona con menor promedio fue la Benzil adenina con 0%, determinado significancia en las repeticiones (Gráfico N° 5).

Las variables número de hojas por brote, altura de brotes y tasa de velocidad de multiplicación 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, siendo la kinetina la hormona con mayor influencia positiva.

Factor B: Dosis

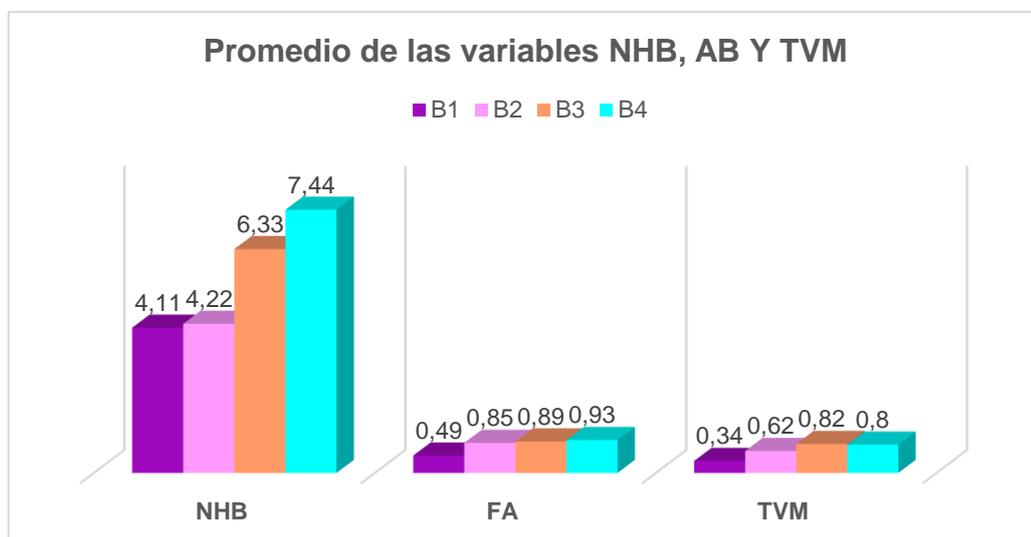
Cuadro N° 6 Resultados de la prueba de Tukey al 5% para comparar promedios de tratamientos FB de las variables Número de hojas por brote (NHB), altura de brotes (AB) y tasa de velocidad de multiplicación (TVM)

NHB			AB			TVM		
Factor B: Dosis	Promedios	Rango	Factor B: Dosis	Promedios	Rango	Factor B: Dosis	Promedios	Rango
B1= 0mg	4,11	A	B4= 6 mg	0,93	A	B3= 6mg	0,82	A
B2= 2mg	4,22	A	B3= 4 mg	0,89	A	B4= 2mg	0,80	A
B3= 4mg	6,33	A	B2= 2 mg	0,85	A	B2= 4mg	0,62	A
B4= 6mg	7,44	A	B1= 0 mg	0,49	B	B1= 0mg	0,34	B

Las letras iguales indican que las diferencias estadísticas no son significativas.

Fuente: Datos obtenidos del ensayo

Gráfico N° 10 Dosis de citoquininas en las variables Número de hojas por brotes (NHB), altura de brotes (AB), taza de velocidad de multiplicación (TVM)



La respuesta agronómica en cuanto a la dosis de las hormonas observada en la variable número de hojas por brote sobresale el B4 (6 mg) con un promedio de 7,44 y la hormona menos efectiva es B1 (0 mg) con 4,11 de promedio. En la variable altura de brote, la dosis con mejor promedio es F4 (6 mg) por lo contrario el menor promedio lo tiene el testigo B1 (0 mg). En la variable taza de velocidad de multiplicación sobresale la dosis de B3 (4 mg) con 0,82 de promedio, la dosis con menor promedio es B1 (0 mg), demostrando que los porcentajes más altos que influyeron en la dosificación para el desarrollo y formación de los brotes de los explantes dentro de la investigación (Cuadro N°6 y Gráfico N°10).

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

5.3 Número de raíz (NR), tamaño de raíz (TR) y volumen de raíz (VR).

Tratamientos (AxB)

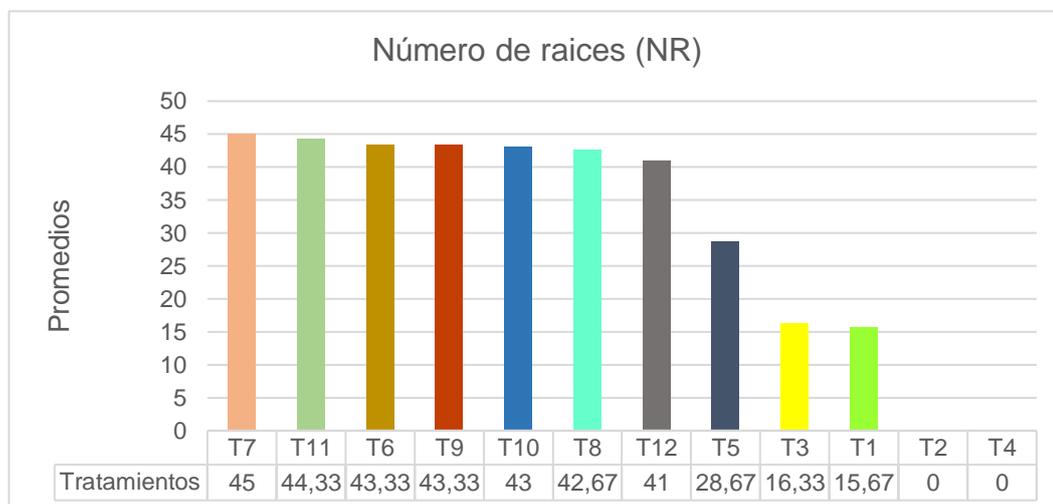
Cuadro N° 7 Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de la interacción (AxB) en las variables Número de raíz (NR), tamaño de raíz (TR) y volumen de raíz (VR).

NR (N/S)			TR (N/S)			VR (**)		
Trat	Promedios	Rango	Trat	Promedios	Rango	Trat	Promedios	Rango
T7	45,00	A	T11	0,63	A	T10	0,58	A
T11	44,33	A	T6	0,60	A	T7	0,55	A
T6	43,33	A	T10	0,60	A	T11	0,53	A
T9	43,33	A	T7	0,47	AB	T8	0,51	A
T10	43,00	A	T8	0,43	AB	T12	0,50	A
T8	42,67	A	T9	0,40	AB	T6	0,44	AB
T12	41,00	A	T12	0,37	AB	T9	0,42	AB
T5	28,67	AB	T5	0,33	AB	T3	0,17	AB
T3	16,33	AB	T3	0,20	AB	T1	0,13	AB
T1	15,67	AB	T1	0,16	AB	T5	0,13	AB
T2	0,00	B	T2	0,00	B	T2	0,00	B
T4	0,00	B	T4	0,00	B	T4	0,00	B
CV= 41,50%			CV= 49,98%			CV= 50,71%		

Promedios con diferente letra, son estadísticamente diferentes al 5%

Fuente: Datos obtenidos del ensayo

Gráfico N° 11 Promedio de los tratamientos AxB de la variable número de raíces (NR)

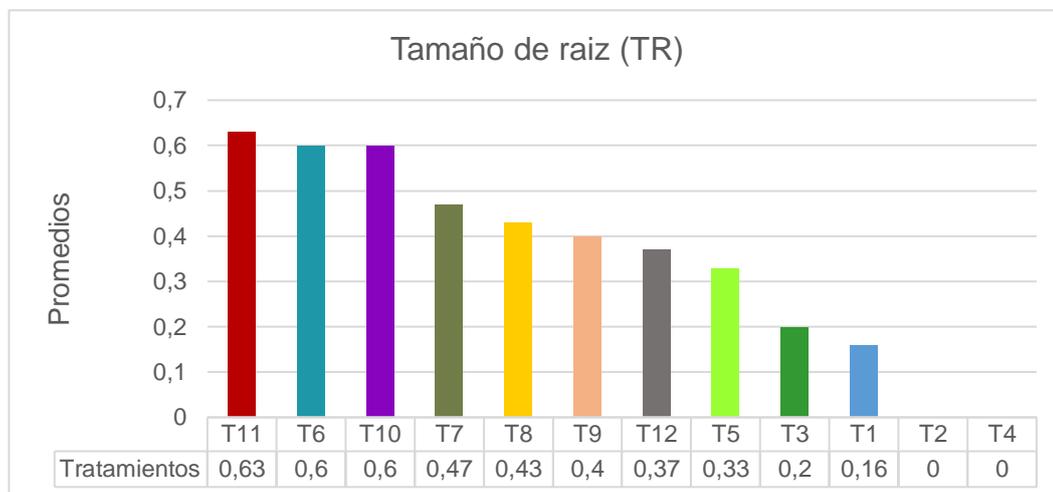


En la variable número de raíces (NR) se presentó una media general de 30,23 y un CV de 41,50%.

De acuerdo con la prueba de Tukey al 5% se demuestra que los tratamientos con mayor número de brotes a los 60 días, fue el T7 (Benzil aminopurina 4 mg) con 45% seguido del T11 (Kinetina 4 mg) y T6 (Benzil aminopurina 2 mg), T9 (Kinetina 0 mg) con 43,33% cada uno, mientras que los tratamientos con menor promedio fueron T2 (Benzil adenina 0 mg) y T4 (Benzil adenina 2 mg) con 0% respectivamente, lo que demuestra que no hay diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro N°7 y Gráfico 11).

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 la misma manera del medio de cultivo donde va a estar establecido, es decir de los nutrientes, cuidados asépticos y sanitarios.

Gráfico N° 12 Promedio de los tratamientos AxB de la variable tamaño de raíz (TR)

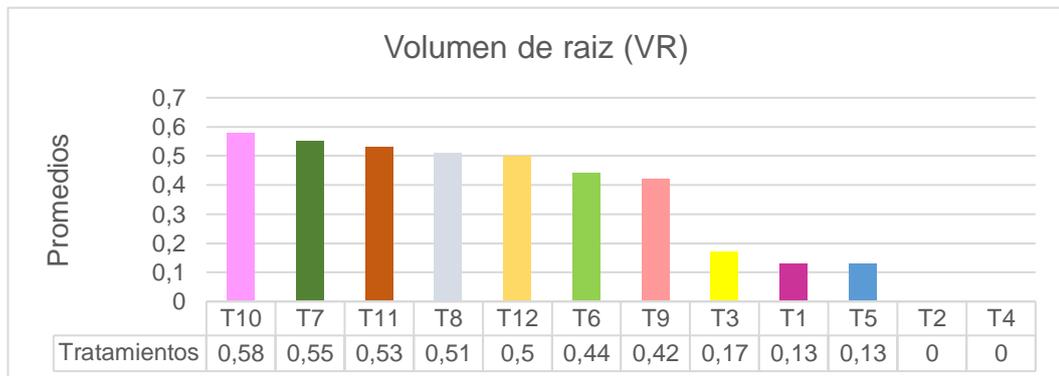


En la variable tamaño de raíz (TR) se presentó una media general de 0,35 y un CV de 49,98%.

De acuerdo con la prueba de Tukey al 5% se demuestra que los tratamientos con mayor número de brotes a los 60 días lo obtuvieron el T11 (Kinetina 4 mg) con 0,63 cm de raíz y T6 (Benzil aminopurina 2 mg) y T10 (Kinetina 2 mg) ambas con 0,6 cm de longitud, así por el contrario los tratamientos con menor promedio son T2 (Benzil adenina 0 mg) y T4 (Benzil adenina 2 mg) con 0% respectivamente, lo que demuestra que no hay diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro N°7 y Gráfico 12).

García (2017) menciona en su investigación sobre frambuesa que es imprescindible que se vigile la calidad y edad de las plantas madre, puesto que a partir de dos o tres años el porcentaje de enraizado disminuye considerablemente, a la vez que se aumenta el riesgo de enfermedades y contaminación por virus; por tanto, este método no asegura la producción de plantas libres de enfermedades.

Gráfico N° 13 Promedio de los tratamientos AxB de la variable volumen de raíz (VR)



En la variable volumen de raíz (VR) se presentó una media general de 0,33 y un CV de 50,71%.

De acuerdo con la prueba de Tukey al 5% se demuestra que los tratamientos con mayor volumen de raíz a los 60 días lo obtuvieron el T10 (Kinetina 2 mg) con 0,58% seguido del T7 (Benzil aminopurina 4 mg) con 0,55% y el T11 (Kinetina 4 mg) con 0,53% mientras que los tratamientos con menor promedio fueron T2 (Benzil adenina 0 mg) y T4 (Benzil adenina 2 mg) con 0% respectivamente, lo que demuestra que no hay diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro N°7 y Gráfico 13).

Las variables TR y VR 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 correcto 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), (AB), (NHB) y (NR).

Los componentes y resultados expuestos en los tratamientos en especial en las variables (TR) y (VR) dependieron de las Citoquininas y dosis presentes en esta investigación. (Cortes, V. 2018) (Cuadro N° 7 y Grafico N°13)

Factor A: Citoquininas

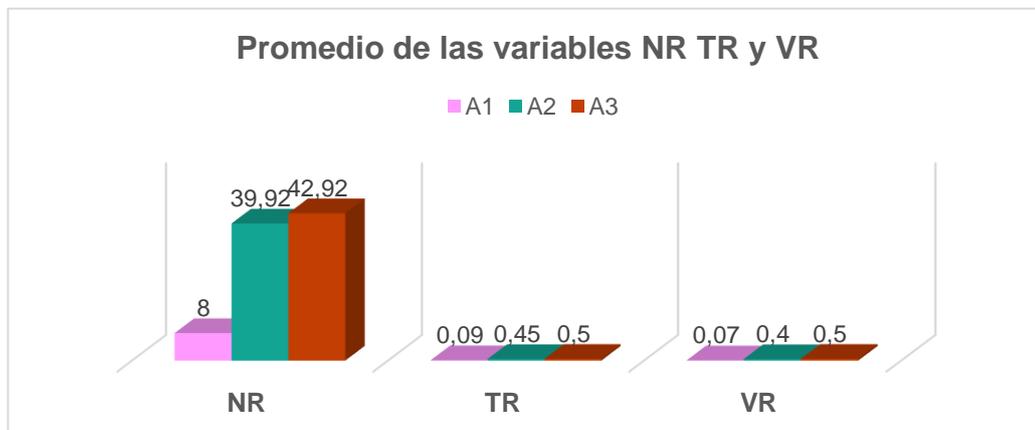
Cuadro N° 8 Resultado del análisis del efecto principal para evaluar promedios del factor A: Variables Número de raíz (NR), tamaño de raíz (TR) y volumen de raíz (VR).

NR			TR			VR		
Factor A: Citoquininas	Promedios	Rango	Factor A: Citoquininas	Promedios	Rango	Factor A: Citoquininas	Promedios	Rango
A1: Benzil adenina	8,00	B	A1: Benzil adenina	0,09	B	A1: Benzil adenina	0,07	B
A2: Benzil aminopurina	39,92	A	A2: Benzil aminopurina	0,45	A	A2: Benzil aminopurina	0,40	A
A3: Kinetina	42,92	A	A3: Kinetina	0,50	A	A3: Kinetina	0,50	A
Efecto principal: A3-A2-A1= 5,00			Efecto principal: A3-A2-A1= 0,04			Efecto principal: A3-A2-A1= 0,03		

Las letras iguales indican que las diferencias estadísticas no son significativas.

Fuente: Datos obtenidos del ensayo.

Gráfico N° 14 Tipo de reguladores de crecimiento en las variables número de raíz (NR), tamaño de raíz (TR) y volumen de raíz (VR)



El análisis del efecto principal factor A, reguladores de crecimiento; Benzil adenina (A1), Benzil aminopurina (A2) y Kinetina (A3), para la variable número de raíz existe un gran efecto de la Kinetina con 42,92%, mientras que la hormona con menor promedio es el Benzil adenina con 8%. En cuanto la variable tamaño de raíz la hormona con mayor influencia es la Kinetina con 0,5% por lo contrario la hormona con menor influencia es la Benzil adenina con 0,9%. En lo que respecta la variable volumen de raíz la hormona con mayor influencia es la Kinetina con 0,5% por lo contrario la hormona con menor influencia es la Benzil adenina con 0,07%, lo que representa no diferencias significativas entre los tipos de hormonas (Cuadro N°8 y Gráfico N°14).

El volumen de la raíz ayuda a la contribución 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 TR y VR, son características varietales los cuales depende de factores físicos, químicos y biológicos del medio de cultivo donde es desarrollado

Factor B: Dosis

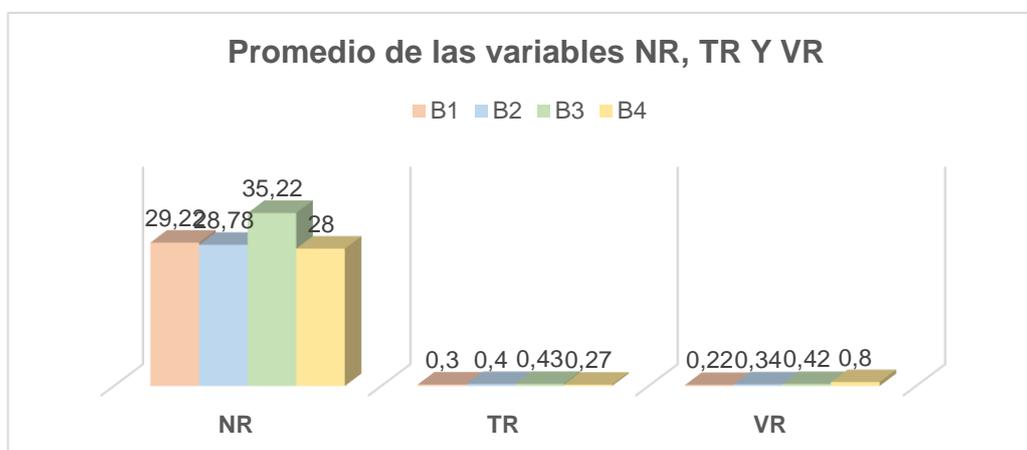
Cuadro N° 9 Resultados de la prueba de Tukey al 5% para comparar promedios de tratamientos FB de las variables Número de raíz (NR), tamaño de raíz (TR) y volumen de raíz (VR).

NHB			TR			VR		
Factor B: Dosis	Promedios	Rango	Factor B: Dosis	Promedios	Rango	Factor B: Dosis	Promedios	Rango
B3= 4mg	35,22	A	B3= 4mg	0,43	A	B3= 4mg	0,42	A
B1= 0mg	29,22	A	B2= 2mg	0,40	A	B2= 2mg	0,34	A
B2= 4mg	28,78	A	B1= 0mg	0,30	A	B4= 6mg	0,33	A
B4= 6mg	28,00	A	B4= 6mg	0,27	A	B1= 0mg	0,22	A

Las letras iguales indican que las diferencias estadísticas no son significativas.

Fuente: Datos obtenidos del ensayo

Gráfico N° 15 Dosis de citoquininas en las variables Número de raíces (NR), tamaño de raíz (TR) y volumen de raíz (VR).



La respuesta agronómica en cuanto a la dosis de las hormonas observada en la variable número de raíces sobresale B3 (4 mg) con un promedio de 35,22 y la hormona menos efectiva es B4 (6 mg) con 28,00 de promedio. En la variable tamaño de raíz, la dosis con mejor promedio es B3 (4 mg) con 0,43 por lo contrario el menor promedio fue B4 (6 mg) con 0,3. En la variable volumen de raíz sobresale la dosis de B4 (6 mg) con 0,8 de promedio, la dosis con menor promedio es B1 (0 mg) con 0,22, demostrando que los porcentajes más altos que influyeron en la dosificación para el desarrollo y formación de los brotes de los explantes dentro de la investigación (Cuadro N°9 y Gráfico N°15).

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

Esto es debido a que se encuentran en proceso de desarrollo y formación de plántulas, cabe indicar que se a obtenido estos resultados debido a las atenciones de cuidados en medios asépticos para eludir contaminación.

5.4 Análisis económico de la relación B/C

Cuadro N° 10 Costo beneficio

ACTIVIDADES	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
Brotos	0	0	0	1	4	5	4	7	8	7	9
Plantas	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Citoquininas	0,06	0,12	0,18	0,00	0,06	0,12	0,18	0,00	0,06	0,12	0,18
Agar	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12
Frascos	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Papel aluminio	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Papel film	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52
Costo total	13,85	13,91	13,97	13,8	13,9	13,9	14	13,8	13,9	13,9	14
Ingreso bruto	0	0	0	7	28	35	28	49	56	49	63
Ingreso neto	-13,9	-13,9	-14	-6,79	14,2	21,1	14	35,2	42,2	35,1	49
R.B/C	0,00	0,00	0,00	0,51	2,02	2,52	2,00	3,55	4,04	3,52	4,51
R.IN	-1	-1	-1	-0,49	1,02	1,52	1,00	2,55	3,04	2,52	3,51

5.4.1 Relación Beneficio – Costo (RB/C e I/C)

La relación beneficio-costo muestra la pérdida o ganancia bruta por cada unidad invertida. Si la relación es mayor que uno se considera que existe un apropiado beneficio; si es igual a uno, los beneficios son iguales a los costos y la actividad no es rentable. Valores menores que uno indican pérdida y la actividad no es rentable. Para establecer la Relación Beneficio-Costo, se procede a dividir el Ingreso Bruto para el Total de Costos de Producción (Leon, C y Quiroz, R, 1994)

Considerando lo económico el mejor tratamiento con superior beneficio costo es el T12 con una dosis de 6mg de Kinetina; es decir que por cada dólar invertido se obtiene de ganancia \$3.51, seguido del T10 con una dosis de 2mg de Kinetina, con una ganancia de \$3,04 por cada dólar invertido (Cuadro N° 10).

Los resultados obtenidos permitieron deducir que la relación beneficio-costo en la producción de plantas de frambuesa mediante cultivo in vitro, en todos los tratamientos es muy superior que la unidad, lo que quiere decir que existe una mayor rentabilidad y recuperación del capital invertido.

VI. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS

Dentro de la investigación se estableció la siguiente hipótesis

Ho: La evaluación de plántulas de frambuesa propagadas mediante multiplicación in vitro utilizando tres tipos de citoquininas en cuatro dosis son similares.

Ha: La evaluación de plántulas de frambuesa propagadas mediante multiplicación in vitro utilizando tres tipos de citoquininas en cuatro dosis son diferentes.

Con base a los datos obtenidos en esta investigación se acepta la hipótesis alterna debido a que las variables Número de frascos contaminados (NFC), Días a la brotación en laboratorio (DBL), Número de brotes por explantes (NBE), Número de hojas por brote (NHB), altura de brotes (AB) y tasa de velocidad de multiplicación (TVM) presentaron un comportamiento significativo, de tal manera que aprueba la hipótesis alterna en la que el desarrollo in vitro de los explantes de frambuesa dependió de la dosis de Citoquininas.

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 Conclusiones

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

- Los estudios preliminares en las fases de desinfección y establecimiento in vitro de *Rubus idaeus. L*, definieron el punto de partida para tener una idea clara de los parámetros a ser evaluados, los protocolos de desinfección y la formulación de los medios de cultivo, con los que consecutivamente se trabajó en la investigación.
- La propagación de frambuesa (*Rubus idaeus. L*) a través de la multiplicación in vitro es viable y segura. El medio de cultivo empleado, M&S y como reguladores de crecimiento se utilizó Benzil adenina, Benzil aminopurina y Kinetina a cuatro dosis (0, 2, 4 y 6 mg), dio buenos resultados en los explantes de frambuesa.
- En lo que respecta al factor A Citoquininas en factor A1 Benzil adenina y A3 Kinetina presentaron los mejores resultados en formación de explantes en cada una de las variables evaluadas. En cuanto al factor B dosis de hormona la que sobresale es 6 mg con la cual se obtuvo mayor número de explantes de frambuesa.
- El tratamiento que presentó mayor porcentaje de contaminación fueron el T1 Benzil adenina 0 mg y los tratamientos que obtuvieron menor contaminación son T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12 (Benzil aminopurina 2-4-6mg, Kinetina 0-2-4-6 mg).
- La mejor opción tecnológica viendo desde el punto económico el mayor beneficio neto fue T12 con una dosis de 6mg de Kinetina; es decir que por cada dólar invertido se obtiene de ganancia \$3.51.

7.2 Recomendaciones

Una vez realizado los diferentes análisis estadísticos se sintetizan las siguientes conclusiones:

- Validar ensayos a mayor escala definiendo cortes y tamaños de los diferentes explantes utilizados en el presente estudio.
- Cumplir con las normas de bioseguridad en laboratorio, para reducir el índice de contaminación.
- Extraer explantes de plantas madre con buenas características; 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.
- Se recomienda utilizar hormonas Benzil adenina y Kinetina (4-6 mg), ya que en la investigación que se realizó se obtuvo los mejores resultados.
- Descubrir nuevas hormonas con sus respectivas dosis para poner en práctica de medios de cultivo, que tiendan a bajar los costos de producción.
- Extender las 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.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, L. (2016). Practicas de laboratorio. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9611/1/UPS-QT07914.pdf>
- Bañados, P. (2002). Frambuesas en Chile: sus variedades y características. Santiago de Chile, Chile: Fundación para la Innovación Agraria, Ministerio Agricultura, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Brissette, L. y George, E. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture. Vol. 1. 3 ed. Springer. pp. 2-3, 205-219.
- Cancino, G., Quevedo, E., Villamizar, C., & Díaz, C. (2015). Propagación in vitro de materiales seleccionados de *Rubus glaucus* Benth (mora de Castilla) en la provincia de Pamplona, región nororiental de Colombia. SciElo, 10. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v17n2/v17n2a02.pdf>
- Castillo, A. (2015). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Obtenido de <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf>
- Castro, F. (2006). Establecimiento in vitro micropropagación de Frambuesa (*Rubus idaeus* L.) utilizando medio semisólido y medio líquido en RITA. Costa Rica: Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- CENTA. (2015). Reguladores de crecimiento in vitro. Obtenido de <http://centa.gob.sv/upload/laboratorios/biotecnologia/2018/Reguladores%20de%20Crecimiento.pdf>

- Chamorro, A., Martínez, S., Fernández, J., & Mosquera, T. (2007). Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento in vitro de *Limonium* var. Misty blue. *SciElo*, 49.
- ChileBio. (2018). Micropropagación. Obtenido de <https://www.chilebio.cl/micropropagacion/>
- CORPEI. (2018). Perfiles de producto Mora-Frambuesa. Obtenido de www.ecuadorcalidaddeorigen.com/productos_down/perfil_de_mora_y_frambuesa_2005763.pdf
- Damasco, L. (31 de Marzo de 2020). "Cultivo de tejidos vegetales. Medios de cultivo." Instituto tecnologico de DC. Altamirano T. Obtenido de <http://alvaradobiotech.blogspot.com/2013/02/tarea-medios-de-cultivo.html>
- Erig, A. (2006). Factores que afectan la Multiplicación in vitro de Mirtilo. *Scientia Agraria*.
- FAO. (1994). The adaptability level of the FAO crop environmental requirements database. United Nations Food and Agriculture Organization (FAO).
- Garcia, C. (2017). El cultivo del frambueso. Servicio regional de investigación y desarrollo agroalimentario. *Redalyc.org*, 2 pp. Obtenido de <https://www.redalyc.org/journal/2631/263158493008/html/#B21>
- Garcia, J., Garcia, G., & Ciordia, M. (2014). El cultivo del frambueso. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA).

García, J., González, G., & Ciordia, M. (2014). El cultivo del frambueso. Obtenido de <http://www.serida.org/pdfs/6085.pdf>

Gomez, A. (02 de Marzo de 2021). Establecimiento In Vitro De Arandano Vaccinium CorymbosuM. Obtenido de https://www.google.com/search?sxsrf=ALeKk01ptBZ5hzXXm1Bp3k5TxFx1R_GRXQ%3A1614729281196&ei=QdA-YNucC6Xr5gKHqppY&q=Establecimiento+In+Vitro+De+Arandano+Vaccinium+Corymbosu+GOMEZ+PDF&oq=Establecimiento+In+Vitro+De+Arandano+Vaccinium+Corymbosu+GOMEZ+PDF&gs_lc

Graciela, M., Roa, J., Aranzales, E., & Debouck, D. (2010). Manuela de procedimientos para la conservacion para la conservacion in vitro del germoplasma del género Manihot. CIAT.

Greenway et al. (2012). A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species in vitro. In Vitro Cel. Develop. Biol. Plant.

INFOAGRO. (2015). EL cultivo de la frambuesa. Obtenido de https://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_frambuesa.asp

INIA. (2009). Propagacion de frambueso (Rubus idaeus L.). Obtenido de <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/123456789/4312/Informativo%20INIA%20N%c2%b0%2036?sequence=1&isAllowed=y>

INTAGRI. (2017). El Cultivo de la Frambuesa. México: Artículos Técnicos de INTAGRI. Obtenido de <https://www.intagri.com/articulos/frutillas/el-cultivo-de-la-frambuesa>

Leon, C y Quiroz, R. (1994). Análisis de Sistemas Agropecuarias. La Paz-Bolivia.

- Llorente, B. (2002). Cultivo in vitro. Obtenido de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/4_-_Cultivo_in_vitro.pdf?sequence=6&isAllowed=y
- Manzano, M. (2013). Perfil del mercado ecuatoriano de la frambuesa. Quito, Ecuador.
- Morales, C. (2009). El frambueso (*Rubus idaeus* L.), morfología y clasificación. Chile: Convenio de Cooperación Berries INIA – INDAP de Chile.
- Nandwani, D. (2015). Micropropagation of *Pinus kesiya* Royle ex Gord (Khasi pine).
- Olmos, S., Luciani, G., & Galdeano, E. (2015). PARTE IV Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Obtenido de https://chilebio.cl/wp-content/uploads/2015/12/Parte_IV.pdf
- PDOT BOLÍVAR. (2012). Obtenido de Plan de desarrollo y ordenamiento territorial de la provincia de Bolivar.
- Perez, I. (2014). Propagacion in vitro y actividad antimicrobiana de extractos de callos obtenidos de especies del género *rubus* spp .” uruapan. Universidad Michoacana De San Nicolás De Hidalgo Facultad De Agrobiología: Michoacán, México.
- PlantasFacilicimo. (2018). Plagas y enfermedades del cultivo de la frambuesa. Obtenido de https://plantas.facilisimo.com/plagas-y-enfermedades-del-cultivo-de-la-frambuesa_2230340.html
- PortalFruticultura.com. (2019). Frambuesa: Guía básica para el manejo del cultivo. Obtenido de

<https://www.portalfruticola.com/noticias/2019/06/10/frambuesa-guia-basica-para-el-manejo-del-cultivo/>

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

Rodríguez, A. (1984). El cultivo de la frambuesa roja. Chapingo, Estado de México: Colegio de Postgraduados.

Ruíz, T., Martínez, J., Castillo, T., Parra, R., Ojeda, D., & Hernández, A. (2018). Establecimiento in vitro de dos cultivares liberados de frutillas: fresa y frambuesa. *SciELO*, 9(4). Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342018000400799

Salazar, Y., Pardo, C., & Buriticá, C. (2007). Especies de Colombia, Ecuador y Perú pertenecientes al género *Gerwasia raciborski* del orden uredinales. *Caldasia*.

Seeram, N., Adams, L., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H., & Heber, D. (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cell in vitro. *J Agric Food Chem*.

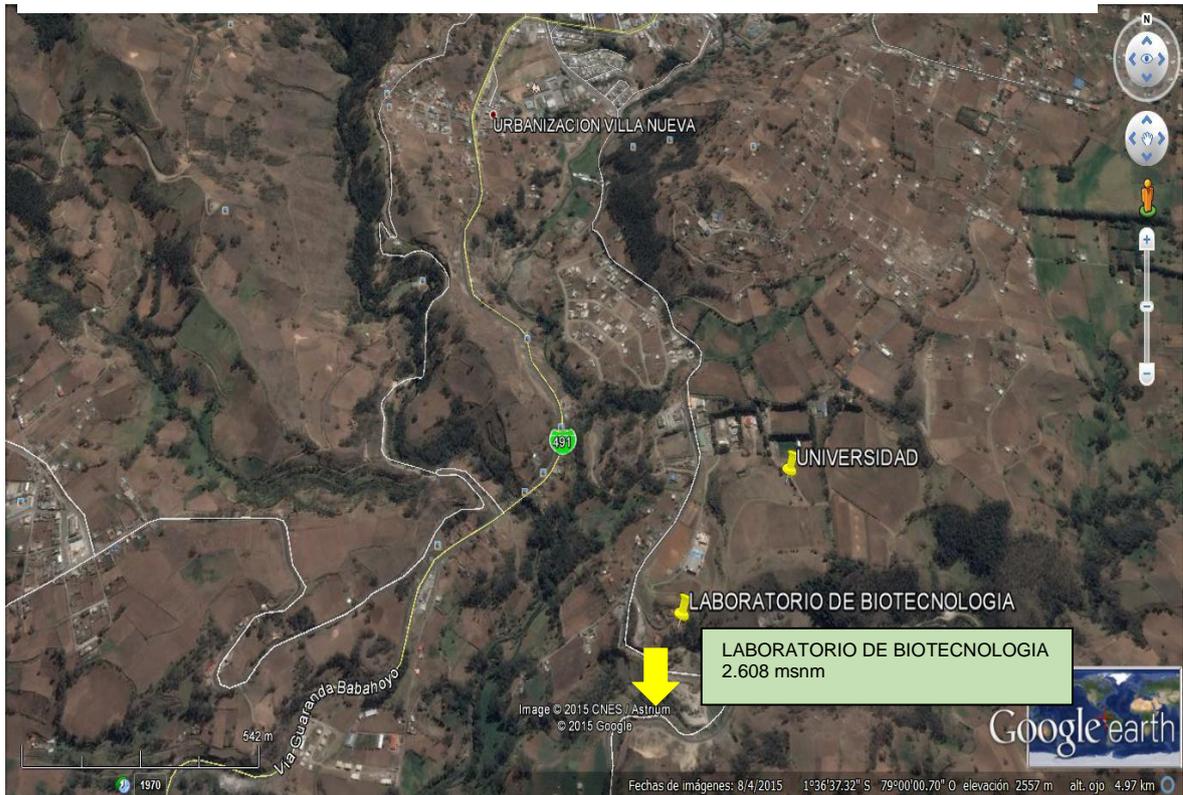
Sistema de Información de Biodiversidad. (2014). Taxonomía para *Rubus*. Obtenido de <http://www.sib.gov.ar/taxonomia/genero/rubus>

Tsao, C. (2005). Virus Infections Reduce In vitro Multiplication of "Malling Landmark Raspberry". *In vitro Cellular and Development Biology Plant* (Vol. 36).

Villalobos, V; Thorpe, T. (1991). Micropropagación: conceptos metodología y resultados. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones prácticas. CIAT.

ANEXOS

Anexo 1 Ubicación de la investigación



Anexo 2 Base de datos

V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13
TRAT	REP	FA	FB	DBL	NBE	NR	VR	TR	NHB	AB	TVM	NFC
1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1
3	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1
4	1	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1
5	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
6	1	2	2	38	4	44	0.1	0.6	2	0.9	0.10	0
7	1	2	3	37	5	44	0.6	0.4	7	1.1	0.5	0
8	1	2	4	35	4	41	0.45	0.4	5	1.1	0.7	0
9	1	3	1	35	7	45	0.45	0.3	4	1.1	0.9	0
10	1	3	2	32	9	44	0.65	0.7	5	1.5	0.9	0
11	1	3	3	37	7	44	0.5	0.7	8	1.3	1.8	0
12	1	3	4	33	9	42	0.45	0.5	6	1.6	1.5	0
1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1
3	2	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1
4	2	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1
5	2	2	1	39	3	43	0.4	0.5	8	1	0.5	0
6	2	2	2	37	3	41	0.61	0.5	5	1.1	0.4	0
7	2	2	3	38	4	45	0.4	0.5	5	1	0.4	0

8	2	2	4	37	5	43	0.45	0.5	4	1.2	0.5	0
9	2	3	1	33	8	43	0.4	0.4	12	1.2	0.8	0
10	2	3	2	34	8	42	0.65	0.5	9	1.6	1.5	0
11	2	3	3	36	6	45	0.65	0.8	10	1.8	2	0
12	2	3	4	33	8	41	0.65	0.3	27	1.7	1.8	0
1	3	1	1	42	4	47	0.4	0.5	4	0.9	0.4	0
2	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1
3	3	1	3	45	0	49	0.5	0.6	6	0	0.7	0
4	3	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1
5	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
6	3	2	2	39	4	45	0.7	0.7	6	1.2	0.8	0
7	3	2	3	39	5	46	0.5	0.5	6	0.9	0.6	0
8	3	2	4	0	38	4	44	0,65	0,4	5	0,9	0,8
9	3	3	1	0	31	7	42	0,4	0,5	9	1,1	0,9
10	3	3	2	0	36	6	43	0,45	0,6	11	1,4	1,9
11	3	3	3	0	34	7	44	0,45	0,4	15	1,9	2,1
12	3	3	4	0	31	9	40	0,4	0,3	20	1,9	1,9

Código de variables de la base de datos:

V₁: Tratamientos

V₂: Repeticiones

V₃: Factor A

V₄: Factor B

V₅: Días a la brotación en laboratorio

V₆: Número de brotes por explantes

V₇: Número de raíces

V₈: Volumen de raíz

V₉: Tamaño de raíz

V₁₀: Número de hojas por brote

V₁₁: Altura de brotes

V₁₂: Taza de velocidad de multiplicación

V₁₃: Número de frascos contaminados

Anexo 3 Manejo de investigación



Fotografía 1: Riego de plantas de frambuesa



Fotografía 2: Cortes de brotes de frambuesa



Fotografía 3: Desinfección de cortes



Fotografía 4: Preparación de medios de cultivo



Fotografía 4: Primera revisión del subcultivo para toma de variables



Fotografía 5: Segunda revisión del subcultivo para toma de variables



Fotografía 6: Frascos contaminados



Fotografía 7: Cuarto de propagación



Fotografía 9: Número de brotes



Fotografía 10: Altura de brotes



Fotografía 11: Monitoreo de los tratamientos



Fotografía 23: Presentación de defensa

Anexo 4 Glosario técnico

Agar: Es un agente gelificante del medio de cultivo.

Agrobiotecnología: Es la tecnología basada en la biología, especialmente usada en agricultura, farmacia, ciencia de los alimentos, ciencias forestales y medicina. Se desarrolla en un enfoque multidisciplinario que involucra varias especialidades y ciencias como biología, bioquímica, genética, virología, agronomía, ingeniería, física, química, medicina y veterinaria entre otras.

Autoclave: Una autoclave es un recipiente de presión metálico de paredes gruesas con un cierre hermético que permite trabajar a alta presión para realizar una reacción industrial, una cocción o una esterilización con vapor de agua. Su construcción debe ser tal que resista la presión y temperatura desarrollada en su interior. La presión elevada permite que el agua alcance temperaturas superiores a los 100 °C. Esterilización: Destrucción de todas las formas de vida microscópicas, incluidos virus y esporas.

Biotecnología: La Biotecnología se define como un área multidisciplinaria, que emplea la biología, química y procesos varios, con gran uso en agricultura, farmacia, ciencia de los alimentos, ciencias forestales y medicina. Probablemente el primero que usó este término fue el ingeniero húngaro Karl Ereky, en 1919.

Cámara de flujo laminar: es un recinto que emplea un ventilador para forzar el paso de aire a través de un filtro HEPA o ULPA y proporcionar aire limpio a la zona de trabajo libre de partículas de hasta 0.1 micras.

Eco tipo: Es una subpoblación genéticamente diferenciada que está restringida a un hábitat específico, un ambiente particular o un ecosistema definido, con unos límites de tolerancia a los factores ambientales. Sanidad

radicular: Se refiere a la incidencia o no de patógenos y plagas a nivel de la raíz en los vegetales.

Esterilización: Destrucción de todas las formas de vida microscópicas, incluidos virus y esporas.

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.

Fitoregulador: Producto regulador del crecimiento de las plantas; normalmente se trata de hormonas vegetales (fitohormonas), y sus principales funciones son estimular o paralizar el desarrollo de las raíces y las partes aéreas.

Genotipos: Un genotipo es la colección de genes de un individuo. El término también puede referirse a los dos alelos heredados de un gen en particular. El genotipo se expresa cuando la información codificada en el ADN de los genes se utiliza para fabricar proteínas y moléculas de ARN. La expresión del genotipo contribuye a los rasgos observables del individuo, lo que se denomina el fenotipo.

Reactivos: toda sustancia que interactúa con otra en una reacción química y que da lugar a otras sustancias de propiedades, características y conformación distinta, denominadas productos de reacción o simplemente productos.

Tejidos vegetales: En los tejidos vegetales superiores las células se agrupan para construir tejidos que desempeñan diversas funciones. Estos

pueden dividirse en tejidos meristemáticos, que ayudan al crecimiento de la semilla a la longitud y grosor de la planta, y en tejidos adultos o definitivos.

Valores FOB: Se utiliza para valorar las Exportaciones y se define como "libre a bordo". Se refiere al Valor de Venta de los productos en su lugar de origen más el Costo de los fletes, seguros y otros Gastos necesarios para hacer llegar la Mercancía hasta la Aduana de salida.