



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS



CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

---

**Tema: Desarrollo de un protocolo de establecimiento *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) a partir de meristemos axilares**

---

Trabajo de Titulación, modalidad Experiencia Prácticas de Investigación y/o Intervención, previa la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

**Autor:** Darío Javier Guamán Carrasco

**Tutor:** MSc. Wilson Patricio Orozco Freire

AMBATO – ECUADOR

Marzo-2018

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

MSc. Wilson Patricio Orozco Freire

### **Certifica**

Que el presente trabajo ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención; el mismo que, responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 16 de Diciembre del 2017



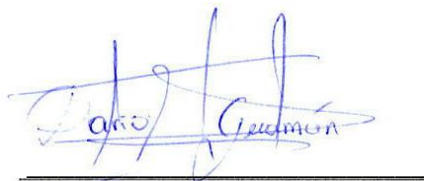
MSc. Wilson Patricio Orozco Freire

C.I:17213600-8

**TUTOR**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Guamán Carrasco Darío Javier declaro que los resultados presentes en el Trabajo de Titulación corresponden a la modalidad de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, son auténticos y personales, a excepción de las citas.



Darío Javier Guamán Carraco

C.I: 180477534-2

**AUTOR**

## APROBACIÓN DE LOS MIEBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación Modalidad Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, el mismo que ha sido elaborado con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



**Presidente del tribunal**



Lic. Mg. Danae Fernández Rivero

C.I. 175718120-9



PhD. Orestes López Hernández

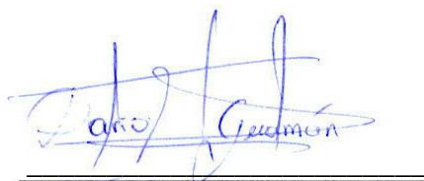
C.I. 175478486-4

Ambato, 30 de Enero del 2018

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y proceso de investigación, según las normas de la investigación.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto de Investigación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Darío Javier Guamán Carraco

C.I: 180477534-2

**AUTOR**

## **DEDICATORIA**

A mi madre Ligia Teresa, quien con sus consejos y apoyo durante toda mi vida ha sido quien me ha guiado, me ha inculcado valores y me ha enseñado a ser mejor una persona cada día.

A mi padre Pedro, quien a pesar de la distancia siempre se ha preocupado y me ha ayudado a seguir adelante para cumplir mis metas.

A mi hermana Lida de los Ángeles y a mi hermano David quienes han sido un apoyo importante para mí, ya que desde niños hemos formado lazos de amistad y hermandad para poder salir juntos hacia adelante

A mis sobrinos Julián y Diego por su cariño que a la vez han sido una razón para poder seguir adelante y ser un ejemplo, para que a su corta edad se den cuenta que no existen metas que no se pueda alcanzar

Dedico también este trabajo a mi novia Lady Fernanda, quien me ha apoyado desde el inicio de la realización de la presente investigación y a pesar de los inconvenientes que se nos han presentado hemos aprendido a permanecer juntos y me ha enseñado que no existen problemas que no se puedan superar.

*Darío Javier Guamán Carrasco*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco de forma muy cordial a la Ing. Alejandra Rivera por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de titulación en las instalaciones del laboratorio de cultivo *in vitro* LePlant, quién además con sus consejos, apoyo y paciencia me ha sabido guiar en el desarrollo de la fase experimental.

Agradezco a la Ing. Paola Rivera por su apoyo y colaboración en la fase experimental de la investigación

Agradezco al Ing. Patricio Orozco, quien con sus constantes consejos me ha guiado para poder desarrollar de la manera más adecuada el presente trabajo de titulación.

Agradezco a los docentes de la Facultad de Ciencia e Ingeniería Alimentos por los conocimientos transmitidos durante el proceso de formación académica

Agradezco a mi familia, a todos mis amigos, compañeros y pareja quienes han sabido apoyarme y animarme durante todo el proceso de formación profesional y personal tanto dentro como fuera del aula de clases.

*Darío Javier Guamán Carrasco*

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

### CAPÍTULO I EL PROBLEMA

1.1	Tema.....	3
1.2	Justificación.....	3
1.3	Objetivos .....	6
1.3.1	Objetivo general .....	6
1.3.2	Objetivos específicos .....	6
2.1	Antecedentes investigativos .....	7
2.1.1	Mora de castilla ( <i>Rubus glaucus</i> Benth).....	7
2.1.2	Cultivo <i>in vitro</i> .....	9
2.1.3	Medio de cultivo.....	10
2.1.4	Etapas del cultivo <i>in vitro</i> .....	13
2.1.5	Cultivo de meristemos .....	15

### CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.2	Hipótesis.....	16
2.2.1	Hipótesis nula.....	16
2.2.2	Hipótesis alternativa.....	16
2.3	Señalamiento de la variables de la hipótesis .....	16
2.3.1	Variable independiente .....	16
2.3.2	Variable dependiente .....	16

### CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Materiales .....	17
3.1.1	Ubicación.....	17
3.1.2	Material vegetal .....	17



3.1.3	Materiales de laboratorio.....	18
3.1.4	Equipos .....	18
3.1.5	Reactivos .....	18
3.2	Metodología.....	19
3.2.1	Selección del material vegetal .....	19
3.2.2	Estudios preliminares utilizando yemas axilares como explante.....	19
3.2.3	Etapas de desinfección utilizando meristemos como explante .....	20
3.2.4	Etapas de establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Rubus glaucus</i> Benth.....	21
3.3	Diseño experimental.....	22
3.3.1	Etapas de desinfección de los explantes de <i>Rubus glaucus</i> Benth.....	22
3.3.2	Etapas de establecimiento <i>in vitro</i> de los explantes .....	22
3.3.3	Unidad experimental.....	23
3.3.4	Variables y métodos de evaluación <i>in vitro</i> .....	23
3.3.5	Tratamientos de estudio.....	25
3.3.6	Análisis estadístico.....	25

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1	Análisis y discusión de los resultados .....	26
4.1.1	Estudios preliminares.....	26
4.1.2	Etapas de desinfección de los explantes de <i>Rubus glaucus</i> Benth.....	27
4.1.3	Etapas de establecimiento <i>in vitro</i> de los explantes .....	38
4.2	Verificación de la hipótesis .....	42

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

5.1	Conclusiones .....	43
5.2	Recomendaciones .....	44

Referencias bibliográficas.....	45
Anexos .....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ubicación del laboratorio de cultivo <i>in vitro</i> LePlant.....	17
<b>Figura 2:</b> Contaminación A fúngica y B bacteriana en yemas axilares .....	26
<b>Figura 3:</b> Porcentaje de contaminación, oxidación y viabilidad para cada variable en la etapa de desinfección. ....	28
<b>Figura 4:</b> Distribución de medias con respecto a la variable contaminación por hongo.....	30
<b>Figura 5:</b> Distribución de medias con respecto a la variable contaminación por bacteria .....	31
<b>Figura 6:</b> Distribución de medias con respecto a la variable oxidado muerto.....	34
<b>Figura 7:</b> Distribución de medias con respecto a la variable viabilidad .....	36
<b>Figura 8:</b> Distribución de medias con respecto a la variable número de hojas .....	41
<b>Figura 9:</b> Plantas de mora de castilla .....	55
<b>Figura 10:</b> Recolección del material vegetal.....	55
<b>Figura 11:</b> Estacas de mora de castilla.....	55
<b>Figura 12:</b> Yemas axilares .....	56
<b>Figura 13:</b> Agua con detergente.....	56
<b>Figura 14:</b> Fungicida.....	56

<b>Figura 15:</b> Hipoclorito de sodio .....	57
<b>Figura 16:</b> Alcohol al 70% .....	57
<b>Figura 17:</b> Proceso de selección y siembra del explante .....	58
<b>Figura 18:</b> A meristemo y B yema vistos en el estereomicroscopio.....	58
<b>Figura 19:</b> A meristemo; B yema.....	58
<b>Figura 20:</b> Contaminación A fúngica; B bacteriana en meristemas axilares.....	59
<b>Figura 21:</b> A oxidado muerto, B oxidado vivo y C no oxidado.....	59
<b>Figura 22:</b> Vitro plantas A medio 1; B medio 2 .....	59
<b>Figura 23:</b> Meristemo sembrado en medio basal MS .....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Métodos de desinfección superficial.....	20
<b>Tabla 2:</b> Medios de cultivo de establecimiento.....	21
<b>Tabla 3:</b> Tratamientos para la fase de desinfección .....	25
<b>Tabla 4:</b> Tratamientos para la fase de establecimiento <i>in vitro</i> .....	25
<b>Tabla 5:</b> Porcentajes de contaminación, oxidación y viabilidad correspondiente a cada tratamiento. ....	27
<b>Tabla 6:</b> Porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica para cada tratamiento de desinfección.....	29
<b>Tabla 7:</b> Porcentaje de oxidación (oxidado muerto, oxidado vivo y no oxidado) para cada tratamiento .....	33
<b>Tabla 8:</b> Porcentaje de viabilidad para cada tratamiento .....	36
<b>Tabla 9:</b> Medio basal Murashige y Skoog (1962).....	50
<b>Tabla 10:</b> Análisis de varianza para la variable contaminación por hongo .....	51
<b>Tabla 11:</b> Prueba de Tukey para la variable contaminación por hongo.....	51
<b>Tabla 12:</b> Análisis de varianza para la variable contaminación por bacteria.....	51
<b>Tabla 13:</b> Prueba de Tukey para la variable contaminación por bacteria .....	52
<b>Tabla 14:</b> Análisis de varianza para la variable oxidado muerto (Necrosis) .....	52
<b>Tabla 15:</b> Prueba de Tukey para la variable oxidado muerto (Necrosis).....	52

<b>Tabla 16:</b> Análisis de varianza para la variable oxidado vivo .....	52
<b>Tabla 17:</b> Análisis de varianza para la variable no oxidado .....	53
<b>Tabla 18:</b> Análisis de varianza para la variable viabilidad .....	53
<b>Tabla 19:</b> Prueba de Tukey para la variable viabilidad.....	53
<b>Tabla 20:</b> Análisis de varianza para la variable longitud .....	53
<b>Tabla 21:</b> Análisis de varianza para la variable número de hojas .....	54
<b>Tabla 22:</b> Prueba de Tukey para la variable número de hojas .....	54

## ABREVIATURAS

<b>m:</b>	Metro
<b>cm:</b>	Centímetro
<b>g/L:</b>	Gramos por litro
<b>mg/L:</b>	Miligramo por litro
<b>mL:</b>	Mililitro
<b>pH:</b>	Potencial hidrógeno
<b>°C:</b>	Grado centígrado
<b>msnm:</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>min:</b>	Minutos
<b>MS:</b>	Medio basal Murasige & Skoog
<b>AG<sub>3</sub>:</b>	Ácido giberélico
<b>BAP:</b>	6-bencil amino purina
<b>AA:</b>	Ácido ascórbico
<b>AC:</b>	Ácido cítrico

## RESUMEN

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) se ha convertido en uno de los productos agrícolas de mayor importancia en el país debido a sus propiedades nutricionales, medicinales y potencial económico, lo que le ha permitido tener una gran aceptabilidad en el mercado nacional e internacional. Sin embargo, su propagación vegetativa se ha visto afectada por la presencia de enfermedades y pérdida de calidad del fruto, por lo tanto una alternativa viable para evitar estos inconvenientes es la técnica de cultivo de tejidos vegetales. El objetivo de la presente investigación fue desarrollar un protocolo de establecimiento *in vitro* de mora de castilla a partir de meristemas axilares. Para lo cual se plantearon dos protocolos de desinfección los cuales consistieron en el método A (Hipoclorito de sodio 30% por 10 minutos, alcohol 70% por 1 minuto) y el método B (Hipoclorito de sodio 20% por 12 minutos; alcohol 70% por 2 minutos). Después de la desinfección los explantes fueron introducidos en dos medios de cultivo de establecimiento, el medio 1 (BAP 1mg/L; AG<sub>3</sub> 0.03 mg/L; pH 5.3) y el medio 2 (BAP 1.5 mg/L; AG<sub>3</sub> 0.03 mg/L; pH 5.8), cada etapa contó con un tratamiento control. En la desinfección, utilizando el método A se registró un porcentaje de viabilidad del 89,33%. En el establecimiento, el medio de cultivo 2 presentó el mejor resultado de crecimiento con una media de 0.7±0.1cm con hojas grandes y vigorosas. Los tratamientos planteados permitieron la introducción *in vitro* de mora de castilla con un óptimo desarrollo.

**Palabras clave:** mora de castilla, productos agrícolas, protocolo de establecimiento *in vitro*, protocolo de desinfección, meristemas axilares.



## ABSTRACT

The castilla blackberry (*Rubus glaucus* Benth) has become one of the agricultural products of importance in the country due to its nutritional, medicinal properties as its economic potential, which has allowed having great acceptance in both national and international market. However, its vegetative propagation has been affected by diseases, producing loss of the fruit quality. Plant tissue culture is offered as an alternative to these issues. The aim of this research was to develop an *in vitro* protocol for the establishment of castilla blackberry from axillary meristems. For this, two disinfection protocols were proved; method A (10 minutes 30% sodium hypochlorite, alcohol 70% for 1 minute) and the method B (sodium hypochlorite 20% for 12 minutes; 70% for 2 minute alcohol). For establishment of the meristems, two mediums were developed; medium 1 (1 mg/L BAP; AG3 0.03 mg/L; pH 5.3) and medium 2 (BAP 1.5 mg/L; AG3 0.03 mg/L; pH 5.8), A control treatment was done for each experiment. As results, 89, 33 % of explant viability was achieved using method A of disinfection. Using medium 2, an average growth of  $0.7\pm 0.1$ cm was produced, with large and vigorous leaves.

**Key words:** castilla blackberry, agricultural products, *in vitro* protocol for the establishment, disinfection protocol, axillary meristems.

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de países latinoamericanos dependen económicamente de la producción y comercialización de productos agrícolas, de los cuales se da preferencia a las frutas y hortalizas (Ayala, Valenzuela, & Bohórquez, 2013).

Debido a la alta productividad y valor económico, la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) se ha transformado en uno de los rubros de mayor importancia. Esta especie se encuentra en zonas tropicales de Suramérica, su fruto se distingue por el color rojo oscuro y su sabor característico, además de poseer un alto contenido de fenoles y vitamina C lo que la hace muy apetecida en el mercado (Pilar, Martínez, & Stashenko, 2014).

*Rubus glaucus* Benth se cultiva con objetivos comerciales en varios países de América, especialmente en Ecuador y Colombia. En Ecuador se la encuentra en los valles del callejón interandino y estribaciones de la sierra (Vaca, 2012).

La mayoría de agricultores prefieren la siembra de esta especie ya que la ausencia de espinas logra facilitar los labores de poda y cosecha de los cultivos (Lluguín, 2015).

La propagación de la planta se realiza por dos métodos, en los que se encuentran el sexual y asexual. El método sexual es poco utilizado debido a que presenta baja cantidad de semillas fértiles en cada fruta, bajo poder germinativo, largos periodos de germinación y lento desarrollo de la planta. El método tradicionalmente utilizado es el asexual pero presenta inconvenientes por la fácil diseminación de enfermedades y variabilidad genética (Vaca, 2012).

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica desarrollada como parte de la biotecnología para obtener material vegetal de mayor calidad y uniformidad. Esta metodología permite reproducir clones genéticamente idénticos de especie frutales de forma rápida sin ser afectados por cualquier variación ambiental (Cancino, Quevedo, Edilia, & Díaz, 2015)

El cultivo *in vitro* es practicado con éxito en diferentes especies como hortícolas, ornamentales y leñosas; esta técnica ha demostrado tener importantes ventajas en comparación con los sistemas tradicionales de propagación de material vegetal **(Muñoz & Reyes, 2006)**.

Por medio de la propagación se puede obtener un cultivo inocuo en donde toda la descendencia lleva igual información genética. Esta es una de las técnicas que tiene mayor aplicabilidad para obtener plantas sin contaminación, producción de metabolitos y mejora genética a partir de tejidos vegetales **(Orozco, 2012)**.

Según **Muñoz & Reyes (2006)**, el cultivo de tejidos vegetales permite introducir material de mora de castilla libre de cualquier tipo de contaminación causada por bacterias, hongos, nematodos, virus o insectos, que pueden desencadenar enfermedades que afectan directamente el desarrollo y producción de la planta, ocasionando pérdidas en la calidad del fruto.

El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar un protocolo de establecimiento *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) a partir de meristemos axilares para la propagación masiva de clones con el fin de comercializar este material de mejor calidad.

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA

### 1.1 Tema

DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus* Benth) A PARTIR DE MERISTEMOS AXILARES

### 1.2 Justificación

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) o mora sin espinas es una de las especies del genero *Rubus* más conocido y cultivado en Suramérica. El fruto de *Rubus glaucus* es rico en minerales y vitaminas siendo muy apetecido por sus propiedades nutricionales y medicinales lo que le ha dado una gran aceptabilidad en el mercado (**Ramírez, Aristizábal, & Restrepo, 2013**).

Según **Ruiz & Sepúlveda (2016)**, el fruto de *Rubus glaucus* Benth se destaca por tener una alta actividad antioxidante debido a que contiene ácido gálico, antocianinas, entre otros. Además de ser una fuente rica en polifenoles, ácido benzoico y flavonoides.

**Vaca (2012)**, registró que en el año 2008, Ecuador incrementó significativamente la exportación de mora, llegando a comercializar 22 mil dólares, lo que representa aproximadamente 12 toneladas de mora, equivalente al 241.25% más con respecto al año 2007.

En Ecuador la mora de castilla tiene gran importancia, siendo la más aceptada por agricultores, industria y consumidores; el 98% de la superficie de cultivos de mora corresponde *Rubus glaucos* Benth. A nivel industrial la mora de Castilla tiene preferencia debido a que genera mayores rendimientos en pulpa y mayor calidad en comparación de otras variedades (**Mejía, 2011**).

La multiplicación de la planta de mora de castilla va en aumento debido a la alta producción de fruta. A pesar de esto, tiene grandes limitaciones en cuanto a su propagación vegetativa, que tradicionalmente se hace por acodos o estacas; provocando el incremento de la introducción de plagas y enfermedades a la planta, además este tipo de propagación no permite tener un buen enraizamiento lo que baja la producción y calidad del fruto, representando pérdidas económicas para los agricultores (**Cancino et al., 2015**).

**Valderrama, Alvarez, Barrero, Robayo, & Núñez (2009)**, sugieren que propagación vegetativa no permite contar con ningún tipo de norma de calidad fisiológica ni sanitaria y no ofrece seguridad de la identidad genética del material vegetal.

Para evitar este tipo de inconvenientes, la técnica de cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro* ha sido desarrollada con el fin de propagar de forma masiva clones con la característica de ser libres de algún tipo de patógenos o enfermedades. La propagación se realiza a partir de una porción de tejido vegetal (explante), garantizando calidad y uniformidad de los nuevos clones que pueden ser comercializados en viveros, generando ingresos económicos para quien multiplica este tipo de material (**Castro, 2006**).

**Hernández & González (2010)**, indican que uno de los principales problemas que presenta el cultivo *in vitro* es la contaminación microbiana, la cual es causada por hongos, bacterias, levaduras o incluso virus; estos microorganismos son perjudiciales ya que compiten con el explante por los nutrientes, además de causar daños por la colonización de sus tejidos y la expulsión de metabolitos tóxicos en el medio de cultivo.

La desventaja que ha presentado el establecimiento *in vitro* de *Rubus glaucus* Benth a partir de yemas según ensayos realizados por **Sigarroa & Garcia (2011)**, es la contaminación por bacteria endógena; 70% de contaminación ha sido reportada, lo que lleva a la pérdida de material vegetal debido a que la presencia de estos

microorganismos impide el adecuado desarrollo de la planta provocando su muerte en el medio de cultivo.

Una alternativa para evitar la contaminación es el uso de antibióticos en el medio de cultivo; sin embargo, esto provocaría que las bacterias desarrollen resistencia, además que el uso de antibióticos conduce al incremento oxidativo inhibiendo el crecimiento de la planta o su muerte por necrosis (**Valenzuela & Armendáriz, 2000**).

**Pérez (2011)**, indica que a nivel mundial se han realizado investigaciones de cultivo *in vitro* de diferentes especies de *Rubus* como: *R. parvifolius*, *R. caesiu*, *R. idaeus*, *R. fruticosus*; además de híbridos entre mora y frambuesa, las cuales se enfocan en uno de los factores críticos del cultivo *in vitro* como es la desinfección superficial del explante.

La desventaja de los métodos de desinfección previos a la fase de establecimiento, es que no siempre pueden eliminar a toda la población microbiana que se encuentran en la planta *in vivo*, algunos microorganismos tienen la capacidad de permanecer ocultos en los espacios intercelulares o haces conductores, logrando protegerse de cualquier agente químico utilizado en la desinfección; introduciéndose y contaminando después el medio de cultivo (**Capó, 2000**).

**Muñoz (2012)**, reporta que una de las técnicas viables para la obtención de plantas libres de cualquier tipo de contaminación microbiana es el cultivo de meristemas debido a que esta pequeña zona de tejido vegetal generalmente no se ven afectada por ningún patógeno. Según **Pérez (2005)**, esto ocurre porque no existe una conexión directa entre el meristemo y el tejido vascular de la planta, que es por donde se movilizan virus y bacterias lo que impide su invasión, permitiendo tener brotes sin contaminación alguna.

Por este motivo el presente trabajo tiene como objetivo desarrollar un protocolo establecimiento *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) a partir de

meristemas axilares para la propagación masiva de clones con el fin de comercializar este material de mejor calidad.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo general**

- Desarrollar un protocolo de establecimiento *in vitro* de mora de castilla “*Rubus glaucus* Benth” a partir de meristemas axilares.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Realizar estudios preliminares de las fases de desinfección y establecimiento *in vitro* de *Rubus glaucus* Benth
- Estandarizar un método de desinfección adecuado para la introducción *in vitro* de *Rubus glaucus* Benth
- Determinar el porcentaje de contaminación y oxidación en la fase de desinfección.
- Determinar el porcentaje de viabilidad en la etapa de desinfección para la introducción *in vitro* de mora de castilla
- Identificar el medio de cultivo óptimo que permita el establecimiento *in vitro* de *Rubus glaucus* Benth

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes investigativos

##### 2.1.1 Mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth)

###### 2.1.1.1 Generalidades

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) o mora sin espinas es una especie perteneciente a la familia Rosáceae, originaria de los Andes Tropicales de América, la cual fue descubierta por Hartw y nombrada por Benth (**Farinango, 2010**).

**Lluguín (2015)**, explica que la variedad de mora sin espinas es resultado de una mutación producida a nivel de las semillas sexuales de mora nativa con espinas de los climas fríos y moderados. Esta variedad fue evaluada, multiplicada y distribuida por diferentes localidades de la provincia de Tungurahua para identificar el comportamiento agronómico que presenta.

*Rubus glaucos* Benth es una fruta oriunda de los andes Ecuatorianos que se cultiva a pequeña escala desde hace más de treinta años, esta planta ha sido encontrada creciendo de forma silvestre entre 2500 y 3000 msnm (**Mejía, 2011**).

A partir del año 2005, en el Ecuador se ha incrementado el área de cultivo de mora para satisfacer la demanda nacional e internacional, contando con 2197 hectáreas cultivadas (**Vaca, 2012**).

###### 2.1.1.2 Taxonomía

La familia Rosáceae a nivel global cuenta con cerca de 700 o más especies y la mayoría se encuentran en el hemisferio sur (**Aguinaga & Guanotuña, 2013**). En el Ecuador esta familia registra 11 géneros, con un total de 68 especies, de las cuales 21



especies pertenecen al género *Rubus*; de este género existen 3 subgéneros: *Orobatus*, *Idaebatus* y *Eubatus* a la que pertenece *Rubus glaucos* Benth (Mejía, 2011).

Clasificación taxonómica según Farinango (2010) y Vaca (2012).

<b>Reino:</b>	Vegetal
<b>Clase:</b>	Angiosperma
<b>Subclase:</b>	Dicotyledonae
<b>Orden:</b>	Rosae
<b>Familia:</b>	Rosáceae
<b>Género:</b>	<i>Rubus</i>
<b>Subgénero:</b>	<i>Eubatus</i>
<b>Nombre científico:</b>	<i>Rubus sp.</i>

### 2.1.1.3 Descripción botánica

*Rubus glaucus* Benth es un arbusto trepador, que tiene varios tallos de 1 y 2 cm de diámetro y que pueden alcanzar a medir 3 m de longitud. Sus hojas cuentan con tres folíolos ovoides de 3 a 4 cm de longitud de base redonda o ligeramente truncada y ápice acuminado, cubiertas por un polvo blanquecino (Aguinaga & Guanotuña, 2013 y Farinango, 2010).

La base de la planta de mora de castilla está formada por una gran cantidad de raíces que pueden llegar a medir más de 1 m de largo (Farinango, 2010).

El fruto de *Rubus glaucos* Benth se forma de varias drupas, las que contienen una semilla. Los frutos pueden variar en su tamaño, desde grandes, medianos o pequeños y su maduración no se da al mismo tiempo debido a que la floración de la planta no es homogénea (Pérez, 2011).

#### **2.1.1.4 Importancia de la especie**

La mora de castilla es uno de los frutos más conocidos y cultivados en Colombia, Ecuador, Perú y Panamá siendo una fuente de trabajo para los agricultores (**Roveda, Ramírez, Peñarada, & Cobra, 2009**).

*Rubus glaucos* Benth es una de las especies del genero *Rubus* que se comercializa masivamente es Suramérica. Sus frutos son consumidos frescos o procesados y se ha incrementado su interés debido a las propiedades medicinales y a la alta actividad antioxidante que posee (**Cancino et al., 2015**).

En el Ecuador debido al pleno crecimiento agropecuario, la mora de castilla ha tenido un incremento en su demanda, debido a que esta presenta mayor número de ramas productivas que la mora tradicional con espinas. Pero ha tenido problemas en cuanto a su propagación por métodos vegetativos (**Zapata, 2014**).

La propagación vegetativa de mora tradicionalmente se hace por acodos o por estacas, el problema con este tipo de propagación es la introducción de plagas y enfermedades que representan problemas económicos para los productores y viveros que trabajan con este tipo de material, además de no contar con ningún tipo de norma de calidad fisiológica ni sanitaria (**Valderrama et al., 2009**).

Según **Sigarroa & Garcia, (2011)**, reportan que a pesar del gran potencial y la riqueza que puede generar el cultivo de mora de castilla presenta limitaciones por el alto costo de semillas certificadas y problemas fitosanitarios por la propagación asexual sin ningún tipo de calidad genética.

#### **2.1.2 Cultivo *in vitro***

Según **Patiño (2011)**, el cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro* se constituye dentro de la biotecnología como una técnica interesante para la producción masiva de plantas y productos naturales. Consiste en aislar porciones de una planta denominados explantes, los cuales son colocados en un medio de cultivo de

composición química definida en condiciones de estricta asepsia para evitar contaminación microbiana.

El cultivo *in vitro* se basa en la “totipotencialidad celular” que es la capacidad de una célula vegetal para formar una nueva planta completa. Una forma de aprovechar esta característica es mediante la utilización de meristemos como material de partida ya que este grupo de células son las que se encargan de dar origen a todas las estructuras de una planta (**Ureta, 2016**).

La ventaja de utilizar el cultivo *in vitro* es que se puede propagar de forma masiva plantas libres de enfermedades y patógenos en corto tiempo. Además reduce los costos laborales de mantenimiento de plantas en el campo ya que la multiplicación se puede realizar en cualquier época del año debido que se trabaja en condiciones controladas (**Remache, 2011**).

### **2.1.3 Medio de cultivo**

El medio de cultivo es un conjunto de nutrientes como sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas, aminoácidos y agua. Esta combinación puede ser sólida o líquida dependiendo del uso de un agente gelificante (**Remache, 2011**).

Para que el explante se desarrolle adecuadamente se debe proveer al medio macro y micronutrientes, las concentraciones de estos pueden variar dependiendo de la especie vegetal. Los nutrientes junto con el agua son necesarios para el desarrollo y crecimiento de una planta ya que sin ellos esta no podría vivir *in vitro* ni *in vivo* (**González, 2007; Remache, 2011**).

Los medios de cultivo que más se utilizan para la micropopagación de material vegetal son Woody Plant (WP) para plantas leñosas (árboles) y Murashige & skoog (MS) para arbustos, enriquecidos con vitaminas, aminoácidos, fuentes de nitrógeno, fuentes de carbono, hierro y algunos reguladores de crecimiento (**Remache, 2011**).

### **2.1.3.1 Componentes del medio de cultivo**

#### **2.1.3.1.1 Macro y micronutrientes**

Los nutrientes que deben incluirse para el desarrollo y crecimiento del explante son: *macroelementos* como: C, K, N, P, H, O, S, Mg y Ca y los *microelementos* como Fe, Zn, Cl, Cu, Mo, B y Mn (**Castro, 2006**).

#### **2.1.3.1.1 Quelatos**

**Perea, Ojeda, Hernández, Ruiz, & Martínez (2010)**, indican que los quelatos son importantes en la agricultura ya que por su estructura y estabilidad permiten la adición de microelementos a la planta. Entre las principales funciones de estos compuestos químicos están: incrementar la solubilidad de metales como el Fe, Zn y Mn; transportar estos metales hacia la raíz y hojas, una vez ahí el compuesto quelante libera los metales.

#### **2.1.3.1.2 Carbohidratos o azúcares (fuente de carbono)**

El carbohidrato más utilizado en la preparación de medios de cultivo es la sacarosa debido a que se sintetiza y transporta de forma natural en las plantas. La sacarosa actúa como fuente de energía por lo que es de gran importancia para el desarrollo del material vegetal *in vitro* (**Vaca, 2012**).

#### **2.1.3.1.3 Vitaminas**

Las vitaminas favorecen el crecimiento del explante y la ausencia de estas podría ser un factor limitante. Las más utilizadas para enriquecer el medio de cultivo son: la tiamina, el ácido nicotínico y la piridoxina (**Vaca, 2012**).

#### **2.1.3.1.4 Hexitoles**

El hexitol myo-inositol es de mucha importancia en el cultivo *in vitro* ya que cumple con funciones vitales como nutrición de minerales, transporte de azúcar, metabolismo de carbohidratos, estructura de la membrana, formación de la pared celular, homeostasis hormonal y estrés fisiológico; además, favorece el crecimiento del explante. Puede actuar como una fuente de carbohidratos y ha considerado como una vitamina por sus funciones (**Vaca, 2012**).

#### **2.1.3.1.5 Antioxidantes**

Un antioxidante es un compuesto que retarda o inhibe la oxidación de un sustrato propenso a sufrir este fenómeno. El antioxidante puede ser utilizado en forma de solución como un pretratamiento previo a la etapa de desinfección (**Azofeifa, 2009**).

Para evitar el proceso de oxidación *in vitro* **Azofeifa (2009)**, indica que dependiendo de la especie vegetal es necesario agregar un antioxidante al medio de cultivo. Los antioxidantes comúnmente utilizados son el ácido cítrico (AC) y el ácido ascórbico (AA).

#### **2.1.3.1.6 Reguladores de crecimiento**

Para que se dé el desarrollo óptimo de alguna especie vegetal en cultivo *in vitro* se requiere de la adición de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. Estas fitohormonas son compuestos orgánicos que estimulan una respuesta fisiológica. Entre los principales reguladores se encuentran las auxinas, citoquininas y giberelinas (**Castro, 2006**).

Las auxinas están relacionadas con la elongación, dominancia apical, abscisión y enraizamiento. Las más utilizadas son: AIB (ácido indol 1-3 butírico), ANA (ácido naftalenacético), AIA (ácido indolacético) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) (**Remache, 2011**).

Las citoquininas están asociadas con el proceso de división celular. Entre las más utilizadas están: BAP (bencilamino purina), kinetina y 2-ip (isopentenil-adenina) (**Remache, 2011**).

Según **Castro (2006)**, las giberelinas se relacionan con el crecimiento de tallos, esto se debe a que provocan el alargamiento de las células y aumentan la extensibilidad de la pared celular. El ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) es la primera giberelina en ser descubierta, este tipo de hormona permite la elongación de entrenudos y crecimiento de meristemos o yemas (**Orozco, 2012**).

#### **2.1.3.1.7 Agente gelificante**

El gelificante más utilizado es el agar, este permite mantener el tejido vegetal en la superficie, dependiendo de su concentración el medio puede ser sólido o semisólido. La alta concentración del gelificante puede afectar el crecimiento del explante *in vitro* (**Vaca, 2012**).

#### **2.1.4 Etapas del cultivo *in vitro***

##### **2.1.4.1 Selección del explante**

La selección del explante es muy importante ya que de este depende también la respuesta que se dé *in vitro*; mientras más joven sea la planta de la que se extrae el material vegetal mejor será la respuesta, principalmente debido a que tiene zonas de crecimiento más activas que una planta adulta (**Orozco, 2012**).

**Castro (2006)**, reportó que los explantes pueden ser de diferentes tipos como por ejemplo: porciones de tejido, células, granos de polen, semillas, protoplastos entre otros; sin embargo, si lo que se desea es mantener una alta estabilidad genética se prefiere como explante los meristemos apicales y segmentos nodales.

#### **2.1.4.2 Desinfección**

Seleccionado el explante se aplica un proceso de desinfección superficial que consiste en la utilización de distintos agentes desinfectantes como bactericidas, fungicidas en los cuales se destaca al hipoclorito de sodio o calcio. Terminado el proceso de desinfección el explante es trasladado a una cámara de flujo laminar para su siembra en un medio de cultivo estéril en condiciones de estricta asepsia (**Castro, 2006**).

#### **2.1.4.3 Establecimiento *in vitro***

El establecimiento *in vitro* tiene como objetivo primordial obtener un cultivo libre contaminación, en el que los explantes se encuentren sembrados en un medio de composición química definida para su desarrollo y crecimiento; y así, tener plantas vigorosas para el proceso de propagación (**Orozco, 2012**).

#### **2.1.4.4 Multiplicación**

En la fase de multiplicación se espera que los explantes que sobrevivieron a las fases de desinfección y establecimiento generen periódicamente nuevos brotes por medio de división y resiembra al ser sub cultivados en un nuevo medio con auxinas y citoquininas (**Remache, 2011**).

#### **2.1.4.5 Enraizamiento**

En la fase de enraizamiento todas las plantas obtenidas en la fase de multiplicación deben ser traspasadas a un medio que induzca la formación de varias raíces que faciliten la absorción de nutrientes al ser llevadas a un medio externo. El valor comercial del material depende de la uniformidad y calidad de cada vitroplanta (**Orozco, 2012**).

#### **2.1.4.6 Aclimatización**

La aclimatización es la fase final y la de mayor importancia debido a que en esta etapa se da la adaptación de las vitroplanta a un ambiente *ex vitro* (Vaca, 2012).

En esta etapa es importante simular un ambiente con características similares al *in vitro* hasta que el material vegetal se adapte a las nuevas condiciones (Orozco, 2012).

La siembra del material a aclimatar se realiza en una combinación de sustratos asépticos de origen natural o artificial que permitan el crecimiento de cada planta en condiciones ambientales controladas. Las raíces deben tener aireación, disponibilidad de agua y sostén mecánico para un mejor desarrollo (Orozco, 2012).

#### **2.1.5 Cultivo de meristemos**

El cultivo de meristemos es una técnica *in vitro* que permite la propagación de material vegetal genéticamente estable y libre de enfermedades (Remache, 2011).

Es útil para el saneamiento de especies vegetales, fundamentado en la distribución no uniforme de microorganismos en la planta. El reconocer la zona en donde se encuentra el meristemo varía dependiendo de la especie; por lo cual, estudios preliminares son necesarios para identificar su ubicación y manipulación adecuada y así facilitar la extracción (Pérez, 1998).

El meristemo es una estructura dinámica en donde se da crecimiento y división celular continuamente. Estos se clasifican según su origen, posición y la estructura que originan como: meristemos apicales o primarios del tallo y raíz y los secundarios como los axilares (Patiño, 2011).



## **2.2 Hipótesis**

### **2.2.1 Hipótesis nula**

El protocolo desarrollado en base a la combinación de agentes desinfectantes y concentración de componentes del medio de cultivo no permiten el establecimiento *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) a partir de meristemas axilares.

### **2.2.2 Hipótesis alternativa**

El protocolo desarrollado en base a la combinación de agentes desinfectantes y concentración de componentes del medio de cultivo si permiten el establecimiento *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) a partir de meristemas axilares.

## **2.3 Señalamiento de las variables de la hipótesis**

### **2.3.1 Variable independiente**

Protocolo de desinfección y establecimiento *in vitro*

### **2.3.2 Variable dependiente**

Desarrollo de los meristemas axilares de mora

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales

##### 3.1.1 Ubicación

El trabajo se desarrolló en las instalaciones del laboratorio de cultivo *in vitro* LePlant, ubicado en la Av. Los Guaytambos y la Delicia en la provincia de Tungurahua, cantón Ambato.



**Fuente:** Google Maps

**Figura 1:** Ubicación del laboratorio de cultivo *in vitro* LePlant

##### 3.1.2 Material vegetal

El material vegetal fue recolectado a partir de plantas madre de mora de Castilla con aproximadamente 2 años de edad, cultivadas en el vivero Monserrat, ubicado en la provincia de Tungurahua, cantón Patate.

### **3.1.3 Materiales de laboratorio**

- Vasos de precipitación
- Mecheros
- Probeta
- Matraz Erlenmeyer
- Tubos de ensayo
- Frascos de vidrio
- Cajas Petri
- Pinzas
- Bisturí
- Servilletas
- Plástico
- Papel aluminio
- Mascarilla
- Cofia

### **3.1.4 Equipos**

- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Balanza analítica
- Plancha de calentamiento
- Agitador magnético
- pH- metro

### **3.1.5 Reactivos**

- Medio Básico Murashige Skoog (M&S)
- Bencilamino purina (BAP)
- Ácido giberélico (GA<sub>3</sub>)
- L-cisteína

- Myo-inocitol
- Tiamina
- Ácido cítrico (AC)
- Ácido ascórbico (AA)
- Hipoclorito de Sodio (NaClO)
- Tween 20 (Tensoactivo)
- Fungicida ( Trimix cobre)
- Alcohol al 70%

## **3.2 Metodología**

### **3.2.1 Selección del material vegetal**

El material vegetal se seleccionó a partir de plantas madre en campo, tomando en cuenta parámetros fitosanitarios como vigor y productividad. De cada planta madre se cortó estacas de aproximadamente 50 cm de longitud de manera aséptica, las cuales fueron envueltas en papel periódico para su almacenamiento y transporte al laboratorio de cultivo *in vitro* Leplant.

### **3.2.2 Estudios preliminares utilizando yemas axilares como explante**

Los estudios preliminares fueron realizados con el propósito de definir un punto de partida para el diseño experimental (tratamientos) de los protocolos de desinfección y establecimiento con los que se trabajó en la investigación. En estas pruebas se utilizó material vegetal fresco recolectado de campo y los explantes fueron yemas axilares de mora de castilla. Estos estudios posteriormente fueron designados como el tratamiento control T0.

Antes del proceso de desinfección se realizó un pretratamiento que consistió en lavar las estacas con jabón comercial y un cepillo. De cada estaca se extrajo segmentos nodales de aproximadamente 1 cm de longitud los que contenían yemas axilares, las cuales fueron colocadas en frascos de vidrio con una solución antioxidante por 5 minutos. A continuación se sometieron los explantes a dos métodos de desinfección

superficial como se indica en la Tabla 1. Después de la exposición a cada agente desinfectante (fungicida, hipoclorito de sodio con Tween 20 y alcohol) se efectuaron dos lavados con agua destilada estéril.

Además, antes de proceder a la siembra, los explantes del método A fueron sumergidos en una solución antioxidante después del último lavado. Los explantes del método B no fueron sometidos al antioxidante.

**Tabla 1:** Métodos de desinfección superficial

<b>Agentes desinfectantes</b>	<b>Método A</b>	<b>Método B</b>
	<b>T1</b> Tiempo (min)	<b>T2</b> Tiempo (min)
Agua con detergente	5	5
Fungicida	20	20
Hipoclorito de sodio 20%	-	12
Hipoclorito de sodio 30%	10	-
Alcohol 70%	1	2

Debido a los altos porcentajes de contaminación y baja viabilidad, se decidió experimentar con meristemos axilares como explantes para continuar con el experimento.

### **3.2.3 Etapa de desinfección utilizando meristemos como explante**

En este ensayo el proceso de desinfección del tejido vegetal fue el mismo detallado anteriormente en la fase de pruebas preliminares, tal y como se detalla en la tabla 1, con la única diferencia que previamente a la siembra del material, se extrajeron los meristemos axilares. Debido a los resultados positivos utilizando meristemos, el resto del procedimiento fue desarrollado en base a este tipo de explante.

Cabe aclarar que para determinar el efecto de desinfección tanto en yemas axilares como en meristemos, estos fueron sembrados en los medios de establecimiento que serán detallados en la siguiente fase.

### 3.2.4 Etapa de establecimiento *in vitro* de *Rubus glaucus* Benth

Para la introducción de los explantes ya desinfectados, se preparó tres medios de cultivo, utilizando como control (T0) el medio basal, Murashige & Skoog (1962) ver (Anexo A: Tabla 9), en T1 y T2 se realizaron las siguientes modificaciones, generando los tratamientos detallados en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Medios de cultivo de establecimiento

Componentes		Medios de cultivo		
		Control T0	Medio 1 T1	Medio 2 T2
Murashige Skoog	Micronutrientes	20 ml	20 ml	20 ml
	Macronutrientes	20 ml	20 ml	20 ml
	Quelatos	20 ml	20 ml	20 ml
Myo-inocitol	-	-	100 mg/L	100 mg/L
Tiamina	-	-	1 mg/L	1 mg/L
L-cisteína	-	-	50 mg/L	50 mg/L
BAP	-	-	1mg/L	1.5 mg/L
Ácido giberélico	-	-	0.03 mg	0.03 mg
Ácido ascórbico	-	-	50 mg/L	50 mg/L
Ácido cítrico	-	-	50 mg/L	50 mg/Lo
Sacarosa	-	-	30g/L	30g/L
Agar	-	-	6.5 g	6.5 g
pH	-	-	5.3	5.8

El medio de cultivo se distribuyó en tubos de ensayo y se esterilizo por 20 minutos a 121 °C y 15 psi.

#### **3.2.4.1.1 Siembra del explante**

La siembra del explante se realizó en la cámara de flujo laminar. Con la ayuda de un estereomicroscopio se procedió a la extracción de los meristemos axilares de cada yema, los que fueron colocados en tubos de ensayo con los medios de cultivo M1 y M2 (Tabla 2).

Los tubos fueron sellados con plástico y colocados en el cuarto de crecimiento para su incubación a una temperatura de 20°C y un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad.

La evaluación de los meristemos sembrados se realizó cada semana durante 45 días.

### **3.3 Diseño experimental**

#### **3.3.1 Etapa de desinfección de los explantes de *Rubus glaucus* Benth**

En esta etapa se evaluó el efecto producido en el nivel de contaminación, oxidación y viabilidad de los explantes sometidos a una variación de la concentración y tiempo de exposición al hipoclorito de sodio y al alcohol al 70%.

Los datos fueron evaluados mediante un diseño completamente al azar (DCA) con tres replicas, al existir diferencia significativa se realizó una comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey; con lo cual, se determinó el método adecuado para la desinfección de *Rubus glaucos* Benth.

#### **3.3.2 Etapa de establecimiento *in vitro* de los explantes**

En esta etapa se evaluó el efecto de la variación de la concentración de BAP y pH manteniendo constante la de AG<sub>3</sub> en los dos medios de cultivo.

Los datos fueron evaluados mediante un diseño completamente al azar (DCA) con tres replicas, al existir diferencia significativa se realizó una comparación múltiple de

medias con la prueba de Tukey; con lo cual, se determinó el medio de cultivo óptimo para el establecimiento *in vitro* de *Rubus glaucos* Benth.

### **3.3.3 Unidad experimental**

Según Badii, Castillo, Rodríguez, Wong, & Villalpando (2007), definen como unidad experimental al material (planta, animal u objeto) a la que se le aplica un experimento, en este caso la unidad experimental para la desinfección y para el establecimiento fue un tubo de ensayo con un explante sembrado en un medio de cultivo de composición química definida.

Para la investigación, el diseño experimental para la desinfección y establecimiento estuvo estructurado por tres tratamientos por etapa. En la desinfección, el tratamiento control (yemas axilares) constó de 200 unidades experimentales (100 método A y 100 método B). En el caso de los tratamientos 1 y 2 (meristemos axilares), constó de 300 unidades experimentales (50 por T1: método A y 50 por T2: método B, ambos con tres repeticiones).

En el establecimiento, el tratamiento control (M&S básico) constó de 25 unidades experimentales. En el caso de los tratamientos 1 y 2 (M&S modificados), se evaluó los explantes que sobrevivieron a la etapa de desinfección de cada uno de sus tratamientos y sus respectivas repeticiones.

### **3.3.4 Variables y métodos de evaluación *in vitro***

#### **3.3.4.1 Etapa de desinfección de los explantes**

##### **3.3.4.1.1 Porcentaje de contaminación**

El porcentaje de contaminación se determinó con observaciones frecuentes de los tratamientos a partir del día de siembra hasta 20 días después, y se diferenció si la contaminación fue producida por hongo o bacteria. El porcentaje de contaminación se evaluó con la siguiente ecuación:



$$\% \text{ Contaminación} = \frac{\text{número de explantes contaminados}}{\text{total de explantes}} * 100$$

### 3.3.4.1.2 Porcentaje de oxidación

El porcentaje de oxidación se obtuvo al contabilizar los explantes oxidados a partir del día de la siembra hasta 7 días después. Para la evaluación se utilizó una escala de oxidación:

**1= Oxidado muerto:** necrosamiento total

**2=Oxidado vivo:** presencia de necrosamiento pero no en un nivel avanzado, permitiendo viabilidad del explante

**3=No oxidado:** el explante es viable y no presenta oxidación degenerativa de tejido

### 3.3.4.1.3 Porcentaje de viabilidad

Para el porcentaje de viabilidad se obtuvo al contabilizar los explantes establecidos con éxito desde el día de siembra hasta 45 días después y se calculó con la ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{número de explantes viables}}{\text{total de explantes}} * 100$$

### 3.3.4.2 Etapa de establecimiento *in vitro* de los explantes

#### 3.3.4.2.1 Tiempo de brotación

El tiempo de brotación se evaluó mediante observaciones diarias de las unidades experimentales y se determinó la longitud y el número de hojas de los brotes desde el día de la siembra hasta 45 días después.

### 3.3.5 Tratamientos de estudio

**Tabla 3:** Tratamientos para la fase de desinfección

<b>Tratamientos</b>	<b>Descripción</b>
T0 (control)	Método A y B (Desinfección en yemas)
T1 (método A)	Hipoclorito de sodio 30% (10 minutos), alcohol 70% (1 minuto) (Desinfección en meristemos)
T2 (método B)	Hipoclorito de sodio 20% (12 minutos); alcohol 70% (2 minuto) (Desinfección en meristemos)

**Tabla 4:** Tratamientos para la fase de establecimiento *in vitro*

<b>Tratamientos</b>	<b>Descripción</b>
T0 (control)	BAP 0 mg/L; AG <sub>3</sub> 0 mg/L; pH 5.3
T1 (medio 1)	BAP 1mg/L; AG <sub>3</sub> 0.03 mg/L; pH 5.3
T2 (medio 2)	BAP 1.5mg/L; AG <sub>3</sub> 0.03 mg/L; pH 5.8

### 3.3.6 Análisis estadístico

Los datos recopilados fueron procesados en el software estadístico InfoStat versión 2016e y los resultados se analizaron empleando un análisis de varianza (ANOVA).

#### 3.3.6.1 Interpretación

El diseño experimental planteado en el establecimiento *in vitro* de *Rubus glucus* Benth permitió reconocer un método de desinfección adecuado para la introducción *in vitro*; además, indicó cual es el medio de cultivo con la mejor concentración de BAP y pH para el desarrollo y crecimiento del explante.

## CAPÍTULO IV

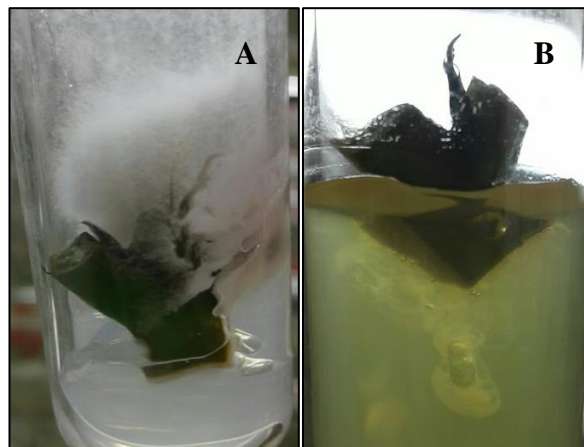
### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Análisis y discusión de los resultados

##### 4.1.1 Estudios preliminares

Los estudios preliminares realizados para la desinfección y establecimiento *in vitro* de mora de castilla tuvieron como objetivo principal definir el punto de partida para tener una idea clara de los parámetros a ser evaluados y modificados en los protocolos de desinfección y la formulación del medio de cultivo de establecimiento, con los que posteriormente se trabajó en la presente investigación. Además, también permitieron determinar el mejor tipo de explante a ser utilizado.

En estos estudios se detectó un elevado porcentaje de contaminación endógena y de oxidación dando como resultado una alta pérdida de material vegetal. El porcentaje de viabilidad obtenido fue de 6.5% lo que representa un bajo número de explantes vivos.



**Figura 2:** Contaminación **A** fúngica y **B** bacteriana en yemas axilares

Debido a estos resultados se decidió continuar con la investigación a partir de meristemas axilares, los que demostraron tener mejores resultados en su introducción y establecimiento.

**Ureta (2016)**, destaca que el cultivo de meristemas se basa en que esté tipo tejido por su ubicación no contiene ningún tipo de patógeno y mientras más precisa sea la extracción de esta estructura menor será el riesgo de contaminación microbiana.

#### **4.1.2 Etapa de desinfección de los explantes de *Rubus glaucos Benth***

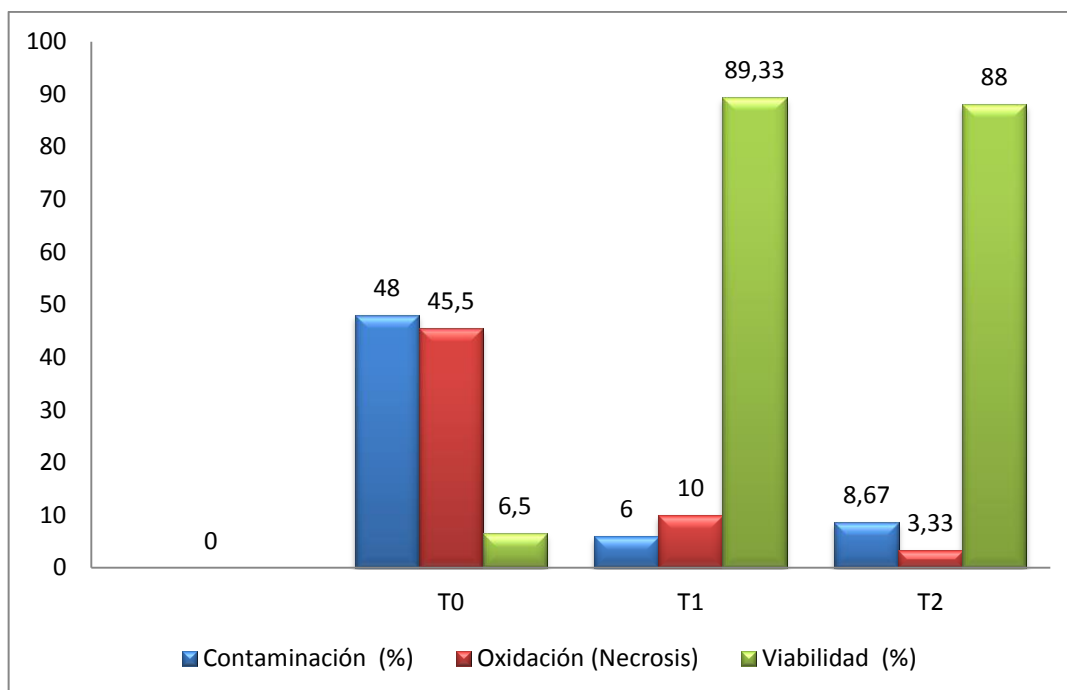
En la etapa de desinfección se plantearon tres tratamientos, los que se detallan en la Tabla 3, en la cual se incluyó el T0 control obtenido de las pruebas preliminares como ya se aclaró anteriormente. Estos fueron evaluados a los 7, 20 y 45 días después de realizada la siembra del explante.

Las variables analizadas fueron: contaminación (hongo, bacteria), oxidación (oxidado muerto, oxidado vivo y no oxidado) y viabilidad.

En la tabla 5 y figura 3 se muestran los porcentajes obtenidos para cada variable evaluada en cada uno de los tratamientos después del proceso de desinfección.

**Tabla 5:** Porcentajes de contaminación, oxidación y viabilidad correspondiente a cada tratamiento.

<b>Tratamientos</b>	<b>Contaminación</b>	<b>Oxidación</b>	<b>Viabilidad</b>	<b>Total</b>
	(%)	(Necrosis) (%)	(%)	(%)
T0	48	45.5	6.5	100
T1	6.67	4	89.33	100
T2	8.67	3.33	88	100



**Figura 3:** Porcentaje de contaminación, oxidación y viabilidad para cada variable en la etapa de desinfección.

Para cada variable se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el fin de identificar si existía o no diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos y de esta forma escoger el mejor método de desinfección.

#### 4.1.2.1 Porcentaje de contaminación

**Orozco (2012)** asevera que el cultivo de tejidos vegetales resulta ser un éxito siempre y cuando se logre controlar y lo más importante prevenir la contaminación microbiana. Entre los fitopatógenos más comunes están los hongos filamentosos, bacterias, levaduras y virus, los cuales impiden el desarrollo de las vitroplantas al colonizar y destruir sus tejidos.

Con el fin de prevenir la contaminación microbiana se han propuesto alternativas como: incrementar las medidas de asepsia con la utilización de desinfectantes usados para cultivo de tejidos y tratamientos de fumigación a las plantas madre (**Orozco, 2012**).

Previo a la desinfección se aplicó un pretratamiento que consistió en el lavado de las estacas con un cepillo para eliminar contaminantes de mayor tamaño, como por ejemplo restos de tierra como propone **Suárez (2011)** ; y posteriormente estas fueron sumergidas en una solución antioxidante (ácido cítrico y ácido ascórbico) para evitar fenómenos de oxidación durante el proceso de establecimiento *in vitro*, como sugiere **Azofeifa (2009)**, quién indica que realizar este proceso previo a la desinfección puede reducir considerablemente el oscurecimiento del tejido vegetal.

Para la eliminación de los patógenos de *Rubus glaucus* Benth se utilizó dos protocolos de desinfección superficial de acuerdo a revisión bibliográfica (**Sigarroa & Garcia, 2011**), con variaciones en tiempos de exposición y concentración de los desinfectantes. La metodología consistió en la inmersión de los explantes en agua con detergente, seguido de la exposición al hipoclorito de sodio y etanol. Finalizando el proceso con 3 lavados con agua destilada estéril.

El porcentaje de contaminación se determinó con observaciones frecuentes de los tratamientos a partir del día de siembra hasta 20 días después, y se diferenció si la contaminación fue producida por hongo o bacteria, los resultados se detallan en la Tabla 6.

**Tabla 6:** Porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica para cada tratamiento de desinfección.

<b>Tratamientos</b>	<b>Hongo (%)</b>	<b>Bacteria (%)</b>	<b>Total (%)</b>
T0	5.21	94.79	100
T1	33.33	66.67	100
T2	23.08	76.92	100

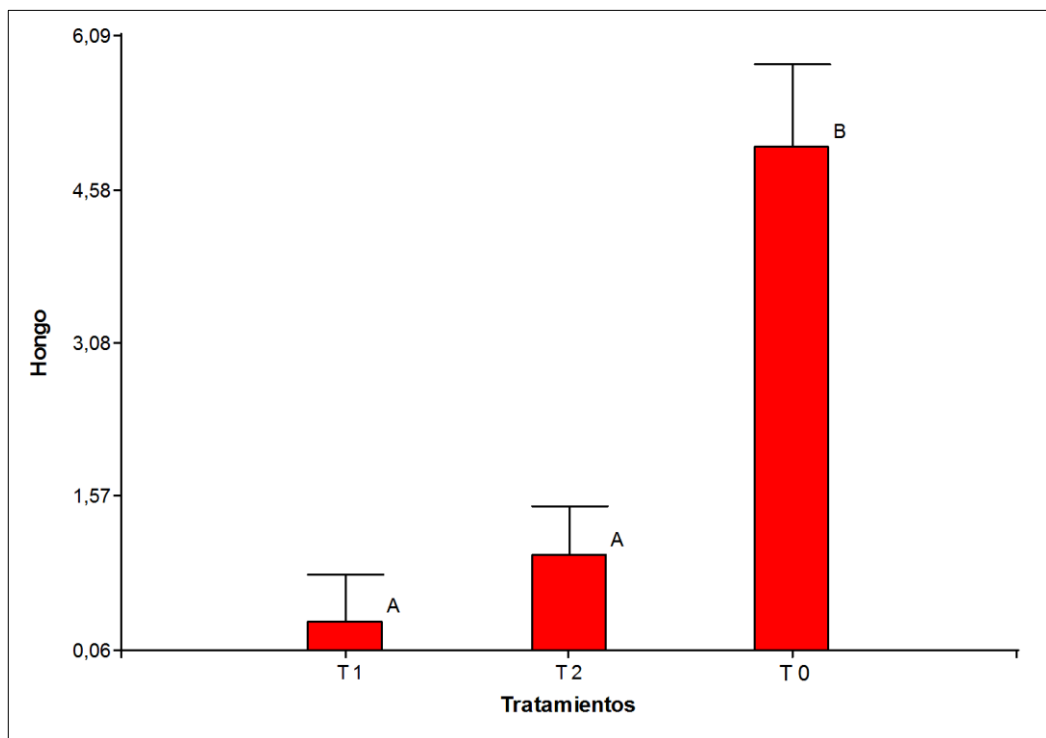
#### **4.1.2.1.1 Contaminación por hongo**

Como se puede observar el tratamiento 1 presenta el porcentaje de contaminación por hongo más alto con un 33.33%. Según **Tortora, Funke, & Case (2007)**, explican que los hongos tiene la capacidad de sobreviven en ambientes hostiles, logrando tolerar variaciones de pH en donde bacterias no se desarrollan. Los hongos

pueden mantenerse latentes en ambientes *in vitro* y expresarse en un periodo de una a dos semanas después de la siembra del explante.

Realizado el análisis de varianza (Anexo A: Tabla 10 ), con respecto a la variable contaminación por hongo, se demostró que existe una diferencia significativa entre los tratamientos ( $p < 0.01$ ), para lo cual se aplicó una comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey (Anexo A: Tabla 11), en donde se observó una diferencia entre el tratamiento control T0 y los otros dos tratamientos.

El análisis para T1 y T2 indica que estadísticamente no hay diferencia significativa entre los dos tratamiento con un ( $P > 0.05$ ). Los resultados se pueden observar de mejor manera en la Figura 4.



**Figura 4:** Distribución de medias con respecto a la variable contaminación por hongo

#### 4.1.2.1.2 Contaminación por bacteria

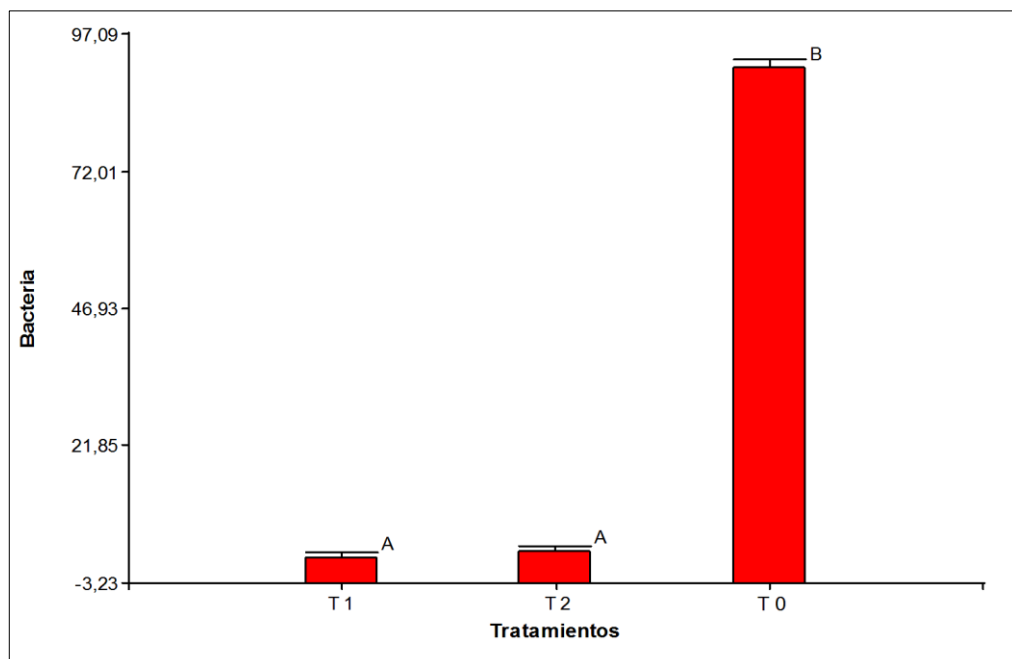
En la Tabla 6 se muestra que el tratamiento control T0, el cual se realizó en yemas axilares presentó el mayor porcentaje de contaminación bacteriana con un 94.79%.

Esto se compara con los resultados obtenidos por **Sigarroa & Garcia (2011)**, quienes reportaron que al utilizar yemas de mora de castilla como explantes obtuvieron hasta un 70% de contaminación endógena.

La contaminación endógena se expresa en cultivos que se realizan a partir de explantes provenientes de árboles adultos propagados de forma vegetativa en el campo. La presencia de este tipo de contaminante causa la reducción en el crecimiento y disminución de la capacidad organogénica para formar brotes y raíces nuevas. El desarrollo bacteriano endógeno se presenta desde el interior de la base de los brotes (**Orozco, 2012**).

Realizado el análisis de varianza (Anexo A: Tabla 12), con respecto a la variable contaminación por bacteria, se demostró que existe una diferencia significativa entre los tratamientos ( $p < 0.0001$ ), para lo cual se aplicó una comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey (Anexo A: Tabla 13), observando una diferencia entre el tratamiento control T0 y los otros dos tratamientos.

El análisis para T1 y T2 indicó que estadísticamente no hay diferencia significativa entre los dos tratamiento con un ( $P > 0.05$ ). Los resultados se pueden observar en la Figura 5.



**Figura 5:** Distribución de medias con respecto a la variable contaminación por bacteria



#### 4.1.2.2 Oxidación

La oxidación es un proceso por el cual uno o varios átomos pierden electrones y los ceden a otros, causando la reducción de los mismos. En sustratos orgánicos la oxidación y reducción se da por la participación de átomos de carbono que se encuentran enlazados de forma covalente a otros átomos (**Azofeifa, 2009**).

**Azofeifa (2009)**, indica que el oscurecimiento de los tejidos en el cultivo *in vitro*, se define como la oxidación por radicales libres de componentes celulares y de compuestos fenólicos que causan daños hasta producir la muerte celular.

Según **Paucar (2011)**, la oxidación fenólica suele aparecer por los cortes realizados durante la preparación de los explantes previo al proceso de desinfección.

El estrés oxidativo del explante se da desde el momento en que éste es retirado de la planta madre, esto va aumentando durante el avance del proceso de introducción *in vitro* (**Castro, 2006**).

Los desinfectantes utilizados en el cultivo de tejidos tienen tendencia a ser abrasivos, por lo que el tiempo de exposición del explante a estos es de mucha importancia debido a que puede causar daño quemándolo y provocando su muerte por necrosis (**Orozco, 2012**).

El porcentaje de oxidación se obtuvo al contabilizar los explantes oxidados a partir del día de la siembra hasta 7 días después, para lo cual se utilizó una escala de oxidación en donde se diferenció si el explante estaba muerto (necrosis), vivo oxidado o no presentaba oxidación.

En la Tabla 7 se observan los porcentajes para la variable oxidación en donde el tratamiento control T0 presenta el mayor porcentaje de explantes oxidados muertos con un 85.71%.

El tratamiento 2 presentó un alto porcentaje de explantes oxidados vivos con un 61.31%, mientras que el tratamiento 1 mostró el mayor porcentaje de explantes no oxidados con un 43.75%.

**Tabla 7:** Porcentaje de oxidación (oxidado muerto, oxidado vivo y no oxidado) para cada tratamiento

<b>Tratamientos</b>	<b>Oxidado muerto (Necrosis) (%)</b>	<b>Oxidado vivo (%)</b>	<b>No oxidado (%)</b>	<b>Total (%)</b>
T0	85.71	6.59	7.69	100
T1	6.94	49.31	43.75	100
T2	3.65	61.31	35.04	100

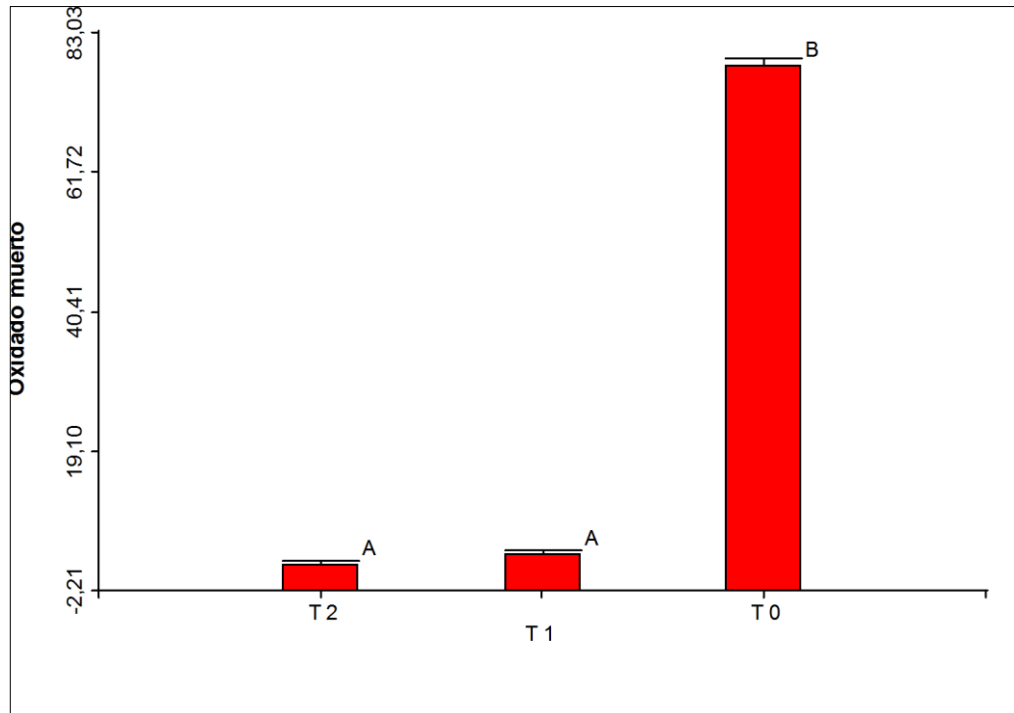
#### **4.1.2.2.1 Oxidado muerto (necrosis)**

Los porcentajes de necrosis en los tratamientos T1 y T2 son muy bajos, estos resultados son positivos ya que la pérdida de explante es mínima. **Ureta (2016)**, asevera que los bajos porcentajes de necrosis se deber a una espontánea oxidación o heridas presentes en el explante.

Los bajos porcentajes de necrosamiento indican que los desinfectantes, los tiempos de exposición y concentraciones utilizadas en los protocolos de desinfección fueron los adecuados.

Realizado el análisis de varianza (Anexo A: Tabla 14) con respecto a la variable oxidado muerto, se encontró que existe una diferencia significativa entre los tratamientos ( $p < 0.0001$ ), para lo cual se aplicó una comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey (Anexo A: Tabla 15), donde se observó una diferencia significativa entre el tratamiento control T0 y los otros dos tratamientos.

El análisis para T1 y T2 indica que estadísticamente no hay diferencia significativa entre los dos tratamiento, con un ( $P > 0.05$ ). Los resultados se pueden observar en la Figura 6.



**Figura 6:** Distribución de medias con respecto a la variable oxidado muerto

#### 4.1.2.2.2 Oxidado vivo

El análisis de varianza (Anexo A: Tabla 16), con respecto a la variable oxidado vivo, demostró que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos ( $p > 0.5672$ ), sin embargo en base a los resultados obtenidos de acuerdo a la Tabla 7, T2 (Hipoclorito de sodio 20% por 12 minutos; alcohol 70% 2 minutos) presenta el mayor porcentaje con respecto a esta variable con un 61.31%.

#### 4.1.2.2.3 No oxidado

El análisis de varianza (Anexo A: Tabla 17), con respecto a la variable no oxidado, demostró que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos ( $p > 0.7852$ ), sin embargo según los resultados que se presentan en la Tabla 7, T1 (Hipoclorito de sodio 30% por 10 minutos; alcohol 70% 1 minuto) presenta un elevado porcentaje de explantes no oxidados con un 43.75%.

### 4.1.2.3 Viabilidad

El proceso de desinfección superficial puede afectar la viabilidad ya que además de eliminar la contaminación microbiana también puede dañar el tejido del explante y su capacidad de regeneración (Ureta, 2016).

Según Vaca (2012), mientras más pequeño sea el explante será más fácil de desinfectar, sin embargo corre mayor peligro ya que por su tamaño este pueden sufrir daños con mayor facilidad.

Debido a esto la viabilidad también indica el número de explantes que sobrevivieron al proceso de desinfección. Según Ureta (2016), la viabilidad se encuentra relacionada de forma directa con el necrosamiento debido a que esta variable se evalúa en los explantes que no están contaminados. Por este motivo mientras menor sea el porcentaje de necrosis mayor será el de viabilidad.

El porcentaje de viabilidad se obtuvo al contabilizar los explantes establecidos con éxito desde el día de siembra hasta 45 días después. En la Tabla 8 se observan los porcentajes obtenidos en donde el tratamiento control T0 presenta el porcentaje más bajo de explantes vivos con un 6.5%.

El tratamiento T1 (Hipoclorito de sodio 30% por 10 minutos, alcohol 70% 1 minuto) presenta un porcentaje de viabilidad de 89.33% y T2 (Hipoclorito de sodio 20% por 12 minutos; alcohol 70% por 2 minutos) con un 88%, lo que indica que la mayoría de explantes sobrevivieron a la etapa de desinfección en los dos tratamientos.

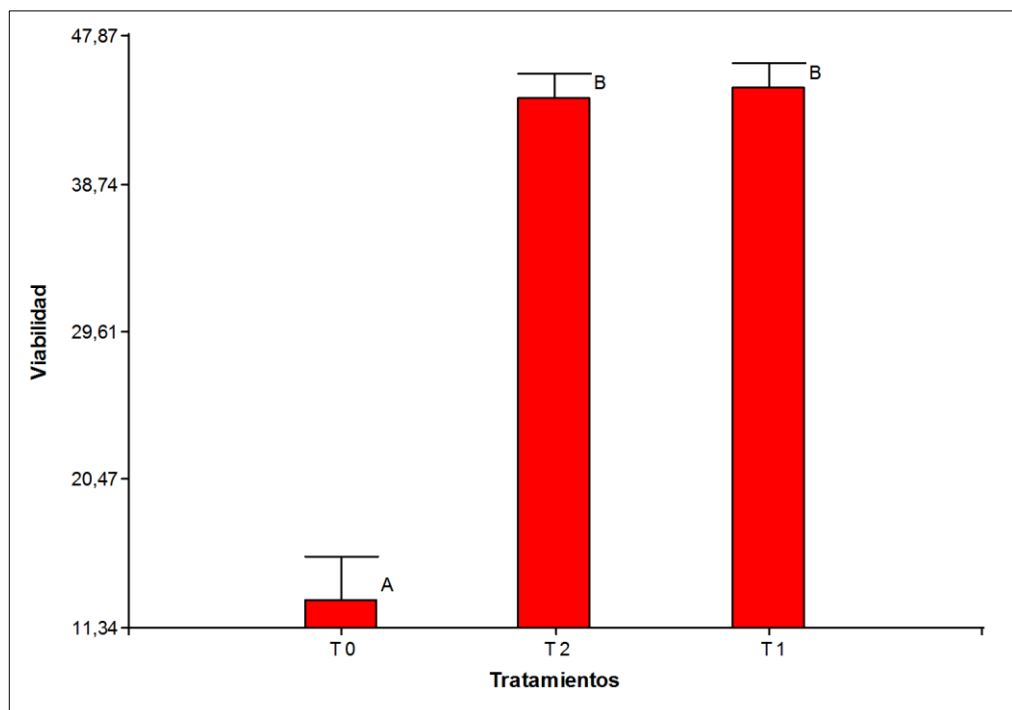
Sigarroa & Garcia (2011), sugieren que al utilizar meristemas de mora de castilla como explantes se puede obtener hasta un 100% de viabilidad.

**Tabla 8:** Porcentaje de viabilidad para cada tratamiento

Tratamientos	Viabilidad (%)
T0	6.5
T1	89.33
T2	88

Realizado el análisis de varianza (Anexo A: Tabla 18), con respecto a la variable viabilidad, se demostró que existe una diferencia significativa entre los tratamientos ( $p < 0.001$ ), y aplicando una comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey (Anexo A: Tabla 19), se observó una diferencia entre el tratamiento control T0 y los otros dos tratamientos.

El análisis para T1 y T2 indica que estadísticamente no hay diferencia significativa entre los dos tratamiento con respecto a la viabilidad, con un ( $P > 0.05$ ). Los resultados se pueden observar en la Figura 7.



**Figura 7:** Distribución de medias con respecto a la variable viabilidad

La introducción de meristemas axilares de mora de castilla como explantes en el presente estudio obtuvo los mejores resultados en los tratamientos T1 y T2 en cuanto a contaminación, oxidación y viabilidad.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la fase de desinfección, la contaminación bacteriana fue la que tuvo mayor incidencia con respecto a la fúngica. El tratamiento que mostro los mejores porcentajes en esta variable fue T1.

Realizada la comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey se encontró que estadísticamente no había diferencia significativa entre los tratamientos T1 y T2 para contaminación bacteriana y fúngica.

En cuanto a la oxidación de acuerdo a los porcentajes obtenidos, T2 presentó los mejores resultados en esta variable; sin embargo, T1 cuenta con un elevado porcentaje de viabilidad esto se debe a que en T1 hubo una mínima pérdida de explantes por contaminación. El porcentaje de oxidación también indica que entre T1 y T2 no existe una diferencia si se realiza o no el lavado con la solución antioxidante previo a la siembra de los explantes.

El tratamiento que presenta un alto porcentaje de viabilidad es T1 con un 89.33% lo que indica que la mayoría de explantes fueron establecidos con éxito. Según **Afanador (2005)**, explica que los tejidos meristemáticos tienden a tener una mejor capacidad regenerativa, lo que incrementa considerablemente la viabilidad del explante.

Por medio del análisis de varianza y las pruebas de Tukey se comprobó que entre T1 y T2 estadísticamente no existe una diferencia entre los resultados de las variables de estudio ya que en los dos tratamientos fueron favorables después del proceso de desinfección.

Después del análisis realizado entre los tratamientos se concluye que debido al alto porcentaje de viabilidad se escoge el método de desinfección A (T1) que consiste en hipoclorito de sodio 30% por 10 minutos, alcohol 70% por 1 minuto.

Según **Ureta (2016)**, desde un punto de vista comercial la diferencia en el porcentaje de viabilidad entre tratamientos por mínima que esta sea representar a largo plazo la pérdida de cientos o miles de plantas que no podrán ser distribuidas lo que implica pérdidas económicas para la empresa.

Además debido a los tiempos de exposición con los que se trabaja en el método A (T1) este permite que el proceso de desinfección se realice en menor tiempo a comparación del método B. El protocolo A permite realizar todo el proceso en 36 minutos lo que en cuestión de producción es muy favorable ya que se logra ahorrar un recurso tan importante como es el tiempo.

#### **4.1.3 Etapa de establecimiento *in vitro* de los explantes**

**Castro (2006)**, reporta que para el establecimiento *in vitro* de una planta se debe primero tomar en cuenta ciertos factores que podrían influir en la respuesta que se va a obtener. Entre algunos de estos están: la época del año en la que se realiza la recolección del material vegetal, estado fisiológico de la planta, tipo de explante (yema, meristemo u hojas) y el tratamiento que se dé a este material previo a la introducción al laboratorio.

Durante esta etapa las fitohormonas más utilizados son las citoquininas que estimulan la división celular, desarrollo y crecimiento de la planta (**Orozco, 2012**).

En la presente investigación se plantearon tres tratamientos, los que se detallan en la Tabla 4, estos fueron evaluados a los 45 días después de realizada la siembra del explante. Las variables valoradas fueron: la longitud y número de hojas de las vitroplantas.

##### **4.1.3.1 Longitud de la planta**

**Orozco (2012)**, explica que la variable longitud de vital importancia en la fase de establecimiento ya que las plántulas que presentan mayor elongación demuestran tener una mejor asimilación a la concentración de las fitohormonas.

Con la ayuda de una regla milimetrada se midió la longitud de cada unidad experimental desde la base de la vitroplanta hasta el ápice del tallo.

El objetivo de este análisis fue determinar si la combinación y concentración de fitohormonas tienen algún tipo de influencia en la en el crecimiento de las vitroplantas para lo cual se realizó un ANOVA.

Realizado el análisis de varianza (Anexo A: Tabla 20), con respecto a la variable longitud, se demostró que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos ( $p > 0.1173$ ).

Sin embargo el tratamiento que presentó mayor elongación es T2 (BAP 1.5 mg/L; AG<sub>3</sub> 0.03 mg/L; pH 5.8), con una media de  $0.7 \pm 0.1$  cm, seguido de T1 (BAP 1 mg/L; AG<sub>3</sub> 0.03 mg/L; pH 5.3) con  $0.67 \pm 0.1$  cm.

Estos resultados reportan una menor longitud de los brotes comparado con las reportadas en la fase de establecimiento del estudio de **Sigarroa & Garcia (2011)**, quienes indican que en su investigación utilizaron 1 mg/L BAP; 0.5 mg/L AG<sub>3</sub> a pH 6, obteniendo una media de crecimiento de 1.2 cm. Llegando a la conclusión de que la concentración de AG<sub>3</sub> también permite obtener una mayor longitud en las vitroplantas después de los 45 días de evaluación.

Los reguladores empleados y la combinación adecuada entre BAP y AG<sub>3</sub>, incrementa el crecimiento y brotación de la planta, lo que quiere decir que la mayor disponibilidad de estos compuestos en el medio de cultivo contribuye a mayor longitud (**Castro, 2006**).

#### **4.1.3.2 Número de hojas**

Las hojas son de gran importancia para las plantas debido a que estas estructuras son las encargadas de realizar funciones importantes como la fotosíntesis, el intercambio de gases y la transpiración (**Alegria, 2016**).



La variable número de hojas se evaluó de forma visual contabilizando las hojas que se encuentran bien formadas en cada una de las vitroplantas.

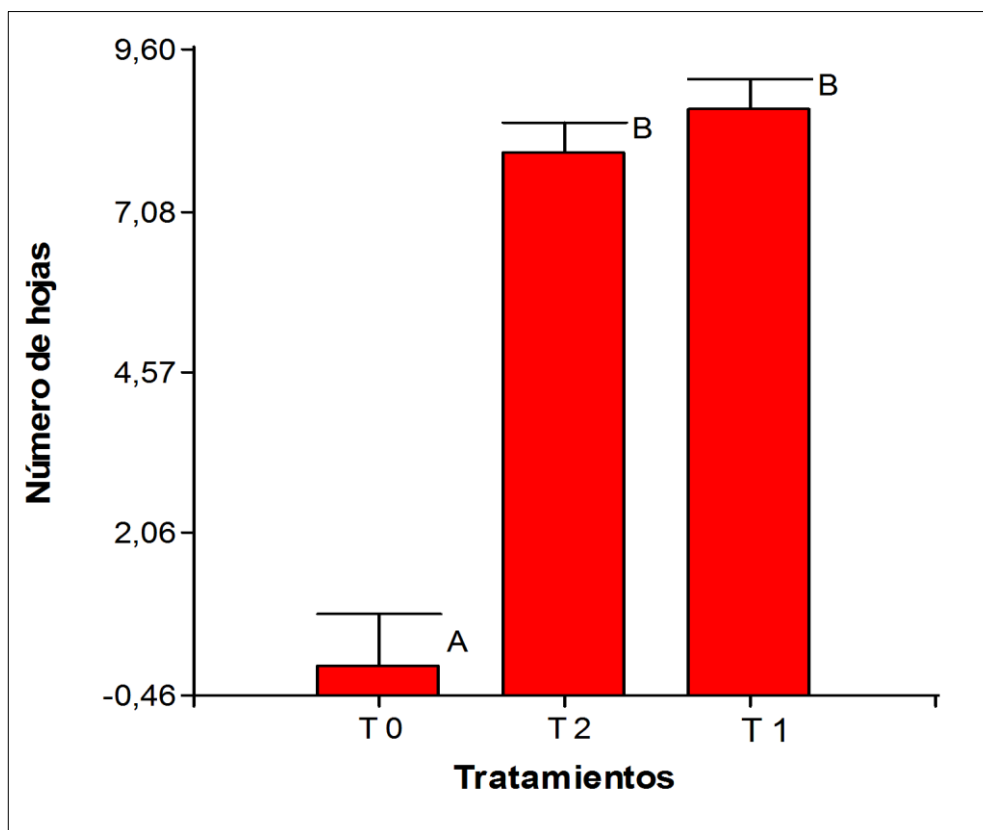
El objetivo de este análisis fue determinar si combinación y concentración de fitohormonas tienen algún tipo de influencia con el número de hojas que presentan los brotes para lo cual se realizó un ANOVA.

Realizado el análisis de varianza (Anexo A: Tabla 21), se demostró que existe una diferencia significativa entre los tratamientos ( $p < 0.001$ ), para lo cual se aplicó una comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey (Anexo A: Tabla 22), en donde se obtuvo que existía una diferencia significativa entre el tratamiento control T0 y los otros dos tratamientos.

El análisis para T1 y T2 indica que estadísticamente no hay diferencia significativa entre los dos tratamientos con respecto al número de hojas con un ( $P > 0.05$ ). Los resultados se pueden observar en la Figura 8.

El tratamiento que presenta mayor número de hojas en las vitroplantas es T1 (BAP 1 mg/L; AG<sub>3</sub> 0.03 mg/L; pH 5.3), con una media de 8.67 seguido de T2 (BAP 1.5 mg/L; AG<sub>3</sub> 0.03 mg/L; pH 5.8) con 8.00.

Estos resultados son mayores a los reportados en la fase de establecimiento por **Sigarroa & Garcia (2011)**, quienes indican que en su investigación utilizaron 1 mg/L BAP; 0.5 mg/L AG<sub>3</sub> a pH 6, obteniendo una media de 5.85.



**Figura 8:** Distribución de medias con respecto a la variable número de hojas

El establecimiento de meristemos axilares de mora de castilla como explantes en el presente estudio obtuvo los mejores resultados en los tratamientos T1 y T2 en cuanto a longitud y número de hojas después de los 45 días de evaluación.

**Sigarroa & Garcia (2011)**, sugieren que para el cultivo de meristemos de *Rubus glaucus* Benth se puede obtener mejores resultados si se realiza una combinación adecuada entre las concentraciones de AG<sub>3</sub> y BAP para un mejor desarrollo tanto en longitud como en producción de hojas.

La variación de pH entre los medios de cultivo también pudo influenciar sobre los resultados obtenidos. **Patiño (2011)** menciona que el pH es un factor que influye en el crecimiento y desarrollo del explante es por esto que en cultivo *in vitro* este debe ajustarse a 5.5 y 5.8. Las variaciones de pH en los medios puede producir disolución del medio, precipitación de sales, inestabilidad de hormonas y vitaminas.

En el análisis de varianza y las pruebas de Tukey se encontró que entre T1 y T2 estadísticamente no existe diferencia significativa para las variables de estudio ya que en los dos tratamientos los resultados fueron favorables en la etapa de establecimiento.

Por este motivo y al no existir una diferencia significativa se escoge el tratamiento 2 (BAP 1.5 mg/L; AG<sub>3</sub> 0.03 mg/L; pH 5.8), debido a que las vitroplantas presentaron mayor longitud con hojas grandes y vigorosas. Además, este tratamiento también permitió tener de dos a tres brotes por vitroplanta, esto significa que al final de los 45 días de evaluación se obtuvo el doble de brotes desarrollados, lo que indica que el medio de establecimiento reaccionó como medio de propagación lo cual resulta ser muy beneficioso a nivel de producción ya que permite establecer y propagar al mismo tiempo.

Los brotes obtenidos en el establecimiento se encuentran listos para la siguiente etapa de multiplicación.

Se debe indicar también que los explantes que fueron sembrados en el medio basal M&S no presentaron ningún desarrollo ya que estos solo aumentaron de tamaño, por lo cual este tratamiento se descarta para el establecimiento *in vitro* de *Rubus glaucus* Benth.

#### **4.2 Verificación de la hipótesis**

De acuerdo a los resultados obtenidos se acepta la hipótesis alternativa que indica que el protocolo desarrollado en base a la combinación de agentes desinfectantes y concentración de componentes del medio de cultivo **SÍ** permiten el establecimiento *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) a partir de meristemas axilares.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

Los estudios preliminares en las fases de desinfección y establecimiento *in vitro* de *Rubus glaucos* Benth, 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 posteriormente se trabajó en la investigación.

En la etapa de desinfección el método A fue el que presentó el porcentaje de viabilidad más alto, siendo éste el protocolo adecuado para la introducción *in vitro* de *Rubus glaucos* Benth. El tratamiento consiste en hipoclorito de sodio 30% por 10 minutos, alcohol 70% por 1 minuto.

Los tratamientos en los que se obtuvieron los porcentajes de contaminación y oxidación idóneos para la desinfección de mora de castilla fueron T1 con 6.67% y T2 con 3.33% respectivamente.

El mejor porcentaje de viabilidad lo presentó el tratamiento 1 con un 89.33% lo que indica que la mayoría de explantes lograron sobrevivir al proceso de desinfección y establecerse en los medios de cultivo con éxito.

El medio de cultivo 2 fue el que presentó el mejor resultado de crecimiento con  $0.7 \pm 0.1$  cm, además contó también con hojas de mayor tamaño y vigorosidad, siendo este óptimo para el establecimiento *in vitro* de mora de castilla. El tratamiento consiste en BAP 1.5 mg/L; AG<sub>3</sub> 0.03 mg/L; pH 5.8.

## 5.2 Recomendaciones

Las plantas madre deben pasar por un tratamiento de fumigación *in vivo* para que de esta manera se reduzca la contaminación *in vitro*.

La recolección del material no se debe realizar en días lluviosos ya que la alta disponibilidad de agua puede incrementar el riesgo de contaminación microbiana *in vitro*.

El material vegetal se debe seleccionar de plantas madre de buena calidad, libres de enfermedades y jóvenes para que así estas tengan una mejor capacidad de regenerar de tejidos y así evitar también la oxidación fenólica.

Debido al bajo porcentaje de viabilidad ya no se debería realizar investigaciones a partir de yemas axilares.

Realizar combinaciones adecuadas entre las concentraciones de BAP y AG<sub>3</sub> en los medios de cultivo de establecimiento para obtener vitroplantas con mayor elongación y producción de hojas.

Se debe continuar con la investigación para las siguientes etapas como son multiplicación, enraizamiento y aclimatación.

## Referencias bibliográficas

- Afanador, A. (2005). *Propagación in vitro a partir de meristemos de cinco variedades comerciales de Dianthus caryophyllus L. ( clavel )*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Aguinaga, M., & Guanotuña, L. (2013). *Evaluación Agronomica y Pomológica de clones experimentales de Mora de castilla (Rubus glaucus Benth) en Cotacachi*. Universidad técnica del norte.
- Alegria, W. (2016). *Texto Básico para profesionales en Ingeniería Forestal en el Área de Fisiología Vegetal*. Loreto.
- Ayala, L. C., Valenzuela, C. P., & Bohórquez, Y. (2013). Caracterización fisicoquímica de mora de castilla ( Rubus glaucus benth ) en seis estados de madurez. *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 11(2), 11.
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153–175. <https://doi.org/1021-7444>
- Badii, M., Castillo, J., Rodríguez, M., Wong, A., & Villalpando, P. (2007). Diseños experimentales e investigación científica ( Experimental designs and scientific research ). *InnOvaciOnes de NegOciOs*, 4(2), 285.
- Bonilla, E. (2014). *Efecto de tratamientos antioxidantes en dos medios de cultivo en el establecimiento in vitro de Fragaria x ananassa a partir de la siembra apolar de láminas foliares*. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

- Cancino, G., Quevedo, E., Edilia, 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. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 7–15. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54262>
- Capó, Y. A. (2000). Control y prevención de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 31, 87–91.
- Castro, F. (2006). *Establecimiento invitro microporagacion de Frambuesa (Rubus idaeus L.) utilizando medio semisólido y medio líquido en RITA*. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Farinango, M. (2010). *Estudio de la Fisiología Postcosecha de la Mora de Castilla (Rubus glaucus Benth) y de la Mora variedad Brazos (Rugus sp.)*. Escuela Politécnica Nacional.
- González, H. (2007). *Evaluación de métodos de desinfección y tipos de explante de la especie vegetal Piper oradendron Trel . & Standl., para el establecimiento in Vitro*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Hernández, Y., & González, M. (2010). Efecto de la contaminación microiana y oxidacion fenolica en el establecimiento in vitro de frutas Perennes. *Cultivos Tropicales*, 31, 5–6. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v31n4/ctr15410.pdf>
- Lluguín, R. (2015). *Uso de auxinas a tres tiempos para enraizamiento de estacas de mora de Castilla sin espinas (Rubus glaucus Benth)*. Universidad Central del Ecuador.
- Mejía, P. (2011). *Caracterización Morfoagronómica de Genotipos de mora (Rubus glaucus benth) en la granja experimental Tumbaco - INIAP*. Escuela politécnica del Ejército.

- Muñoz, I., & Reyes, H. (2006). *Efecto de reguladores de crecimiento, L - cisteína y ácido ascórbico en cultivo in vitro de mora de Castilla (Rubus glaucus Benth)*. Universidad nacional agraria.
- Muñoz, M. (2012). *Bioteconología* (2a ed.). Bernal: Universidad Nacional de Quilmes.
- Orozco, P. W. (2012). *Establecimiento del protocolo de micro propagación de hortensia (hydrangea macrophylla) a partir de segmentos nodales, como una estrategia de producción a gran escala, para su utilización ornamental en los espacios públicos del distrito metropolitano de Q.* Escuela Politécnica del Ejército.
- Patiño, M. (2011). *Evaluación de métodos de desinfección y medios de cultivo para la micropropagación in vitro de Guarango(Caesalpinia apinosa Mol. O. Kuntz)*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Paucar, M. (2011). *Organogénesis directa in vitro a partir de hojas de mora (Rubus glaucus Benth)*. Escuela Politécnica del Ejército.
- Perea, E., Ojeda, D., Hernández, A., Ruiz, T., & Martínez, J. (2010). *Utilización de quelatos en la agricultura*.
- Pérez, J. (1998). *Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología*. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de Plantas.
- Pérez, U. (2011). *Evaluación de un sistema para la micorrización in vitro en la planta de Mora de castilla(Rubus glaucus)*. Pontificia Universidad Javeriana. Retrieved from <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis722.pdf>
- Pilar, J., Martínez, J. R., & Stashenko, E. E. (2014). Contenido de compuestos fenolicos y capacidad antioxidante de extractos de mora (Rubus glaucus Benth) obtenidos bajo diferentes condiciones. *Vitae*, 21(3), 219.



- Ramírez, Q., Aristizábal, T., & Restrepo, F. (2013). Conservación de mora de castilla mediante la aplicación de un recubrimiento comestible de gel de mucílago de penca de sábila. *Vitae*, 20(3), 16–17. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.4.5846>
- Remache, L. (2011). *Desarrollo de tecnicas de micropropagacion in vitro de Cedro (Cedrela montana) a partir de apices, hojas y entrenudos*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Roveda, G., Ramírez, M., Peñarada, A., & Cobra, L. (2009). *Biofertilizacion en el cultivo de Mora (Rubus glaucus Benta). Caracterización, evaluación y producción de material limpio de mora con alto valor agregado*.
- Ruiz, L., & Sepúlveda, O. (2016). *Análisis nutricional y nutraceutici de frutos de Rubus glaucus Benth ( Mora de castilla) material sin espinas cultivado en Apia Risaralda*. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Sigarroa, A., & Garcia, C. (2011). Establecimiento y multiplicación in vitro de mora de castilla ( Rubus glaucus Benth) variedad sin espinas, mediante ápices meristemáticos. *Acta Agronomica*, 60(4), 347–354.
- Suárez, E. (2011). *Micropopagación in vitro de piña ( Ananas comosus L . Merrill ) Híbrido MD-2 , a partir de cortes de yemas laterales y apicales*. Escuela Polotécnica del Ejército.
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiologia*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Ureta, A. (2016). *Desarrollo de un protocolo de de establecimiento in vitro de la flor de verano Delphinium elatum “Black velvet.”* Universidad de los Américas-UDLA.

- Vaca, I. (2012). *Regeneración de plantas completas de Rubus glaucus (Benth), mediante el uso de reguladores de crecimiento*. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Valderrama, A., Alvarez, R., Barrero, L., Robayo, M., & Núñez, V. (2009). *Validación y escalamiento de plantulas de mora in vitro y manejo ex vitro para la entrega a agricultores de Silvania*. Colombia. Retrieved from [http://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/2009122101453\\_Caracterizacion\\_mora.pdf#page=64](http://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/2009122101453_Caracterizacion_mora.pdf#page=64)
- Valenzuela, L., & Armendáriz, E. (2000). Uso de antibióticos en medios de cultivo para reducir la presencia de agentes contaminantes en la propagación in vitro de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L). *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 1, 48.
- Zapata, C. (2014). *Evaluación de la producción de explantes de mora sin espinas "Rubus glaucus Benth" en la fase de multiplicación vegetativa en un sistema de inmersión temporal*. Sangolquí.

## ANEXOS

### ANEXO A

#### ANEXO A-1: Formulación Murashige y Skoog

Tabla 9: Medio basal Murashige y Skoog (1962)

Componente	Fórmula	Cantidad (mg/L)
<b>Macronutrientes</b>	Nitrato de amonio – $\text{NH}_4\text{NO}_3$	1,650.000
	Nitrato de potasio - $\text{KNO}_3$	1,900.000
	Fosfato de potasimonobásico- $\text{KH}_2\text{PO}_4$	170.000
	Sulfato de magnesio heptahidratado - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.000
	Cloruro de calcio dihidratado - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.000
<b>Micronutrientes</b>	Yoduro de potasio – KI	0.830
	Ácido trioxobórico - $\text{H}_3\text{BO}_3$	6.200
	Sulfato de manganeso monohidratado - $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.900
	Sulfato de zinc heptahidratado - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.600
	Molibdato de sodio - $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250
	Sulfato de cobre pentahidratado - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
	Cloruro de cobalto hexahidratado - $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
<b>Quelatos</b>	FeNa EDTA - Sal férrica sódica de ácido	50.000
	Etilendiaminotetraacético	

Fuente: Bonilla, 2014

**ANEXO A-2: Análisis de varianza y prueba de Tukey para cada variable de estudio**

**Etapa de desinfección**

**Tabla 10:** Análisis de varianza para la variable contaminación por hongo

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo.	16,76	2	8,38	12,57	0,01
Tratamientos	16,76	2	8,38	12,57	0,01
Error	2,67	4	0,67		
Total	19,43	6			

Los valores-p indican que existe diferencia significativa entre los tratamientos para lo cual se aplicó una comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey.

**Tabla 11:** Prueba de Tukey para la variable contaminación por hongo

<b>Tratamientos</b>	<b>Medias</b>	<b>N</b>	<b>E.E.</b>
T1	0,33	3	0,47 A
T2	1,00	3	0,47 A
T0	5,00	1	0,82 B

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Tabla 12:** Análisis de varianza para la variable contaminación por bacteria

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo.	6792,10	2	3396,05	1455,45	<0,0001
Tratamientos	6792,10	2	3396,05	1455,45	<0,0001
Error	9,33	4	2,33		
Total	6801,43	6			

Los valores-p indican que existe diferencia significativa entre los tratamientos para lo cual se aplicó una comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey.

**Tabla 13:** Prueba de Tukey para la variable contaminación por bacteria

<b>Tratamientos</b>	<b>Medias</b>	<b>N</b>	<b>E.E.</b>
T1	1,33	3	0,88 A
T2	2,67	3	0,88 A
T0	91,00	1	1,53 B

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Tabla 14:** Análisis de varianza para la variable oxidado muerto (Necrosis)

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo.	4890,10	2	2445,05	1833,79	<0,0001
Tratamientos	4890,10	2	2445,05	1833,79	<0,0001
Error	5,33	4	1,33		
Total	4895,43	6			

Los valores-p indican que existe diferencia significativa entre los tratamientos para lo cual se aplicó una comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey.

**Tabla 15:** Prueba de Tukey para la variable oxidado muerto (Necrosis)

<b>Tratamientos</b>	<b>Medias</b>	<b>N</b>	<b>E.E.</b>
T2	1,67	3	0,67 A
T1	3,33	3	0,67 A
T0	78,00	1	1,15 B

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Tabla 16:** Análisis de varianza para la variable oxidado vivo

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo.	365,33	2	182,67	0,66	0,5672
Tratamientos	365,33	2	182,67	0,66	0,5672
Error	1114,67	4	278,67		
Total	1480,00	6			

Los valores-p indican que no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

**Tabla 17:** Análisis de varianza para la variable no oxidado

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo.	150,86	2	75,43	0,26	0,7852
Tratamientos	150,86	2	75,43	0,26	0,7852
Error	1174,00	4	293,50		
Total	1324,86	6			

Los valores-p indican que no existe diferencia significativa entre los tratamientos

**Tabla 18:** Análisis de varianza para la variable viabilidad

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo.	842,19	2	421,10	58,76	0,0011
Tratamientos	842,19	2	421,10	58,76	0,0011
Error	28,67	4	7,17		
Total	870,86	6			

Los valores-p indican que existe diferencia significativa entre los tratamientos para lo cual se aplicó una comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey.

**Tabla 19:** Prueba de Tukey para la variable viabilidad

<b>Tratamientos</b>	<b>Medias</b>	<b>N</b>	<b>E.E.</b>
T0	13,00	1	2,68 A
T2	44,00	3	1,55 B
T1	44,67	3	1,55 B

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### **Etapa de establecimiento**

**Tabla 20:** Análisis de varianza para la variable longitud

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo.	0,27	2	0,13	3,84	0,1173
Tratamientos	0,27	2	0,13	3,84	0,1173
Error	0,14	4	0,03		
Total	0,40	6			

Los valores-p indican que no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

**Tabla 21:** Análisis de varianza para la variable número de hojas

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo.	60,19	2	30,10	45,14	0,001
Tratamientos	60,19	2	30,10	45,14	0,001
Error	2,67	4	0,67		
Total	62,86	6			

Los valores-p indican que existe diferencia significativa entre los tratamientos para lo cual se aplicó una comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey.

**Tabla 22:** Prueba de Tukey para la variable número de hojas

<b>Tratamientos</b>	<b>Medias</b>	<b>N</b>	<b>E.E.</b>
T0	0,00	1	0,82 A
T2	8,00	3	0,47 B
T1	8,67	3	0,47 B

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## ANEXO B

### ANEXO B-1: Recolección del material vegetal



**Figura 9:** Plantas madre de mora de castilla



**Figura 10:** Recolección del material vegetal



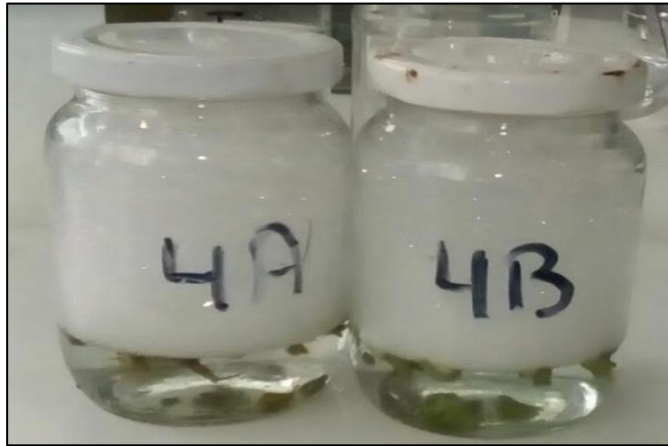
**Figura 11:** Estacas de mora de castilla



## ANEXO B-2: Desinfección del material vegetal



**Figura 12:** Yemas axilares



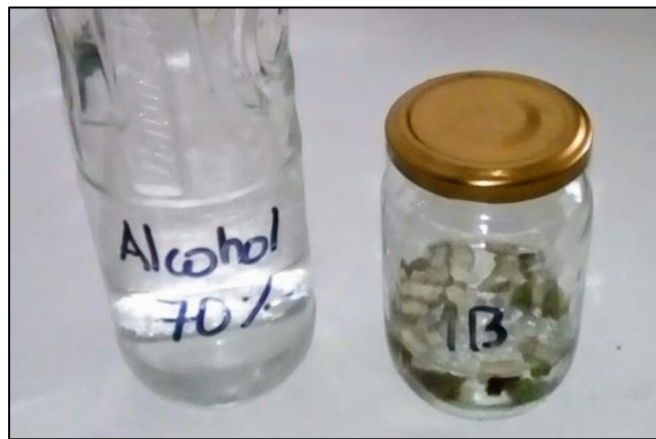
**Figura 13:** Agua con detergente



**Figura 14:** Fungicida



**Figura 15:** Hipoclorito de sodio



**Figura 16:** Alcohol al 70%

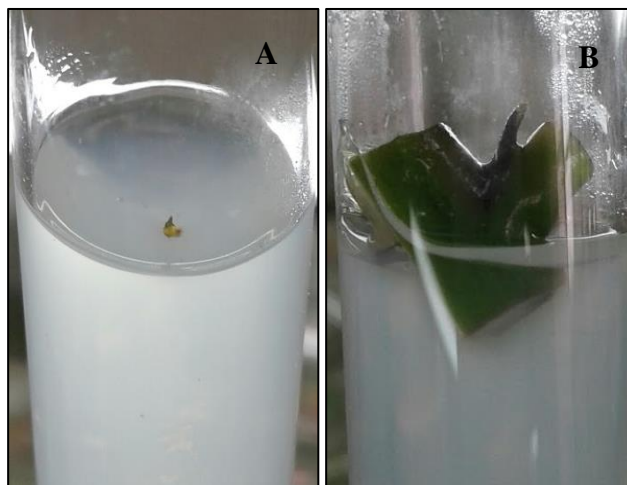
### ANEXO B-3: Selección y siembra del material vegetal



**Figura 17:** Proceso de selección y siembra del explante



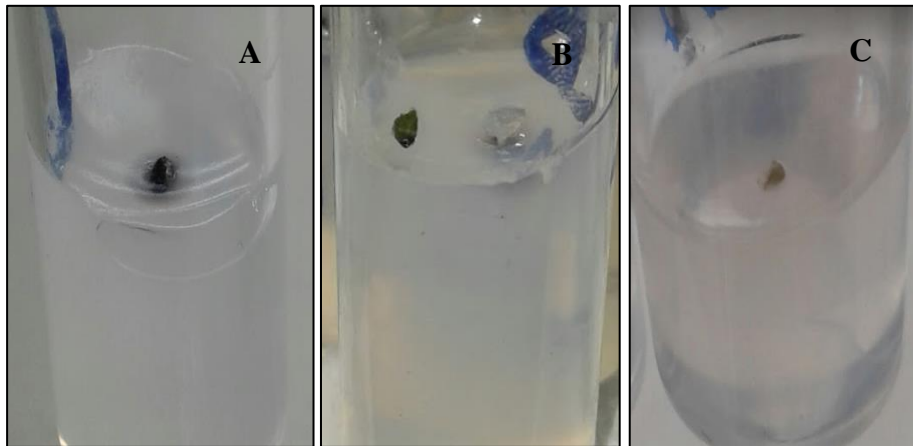
**Figura 18:** A meristemo y B yema vistos en el estereomicroscopio



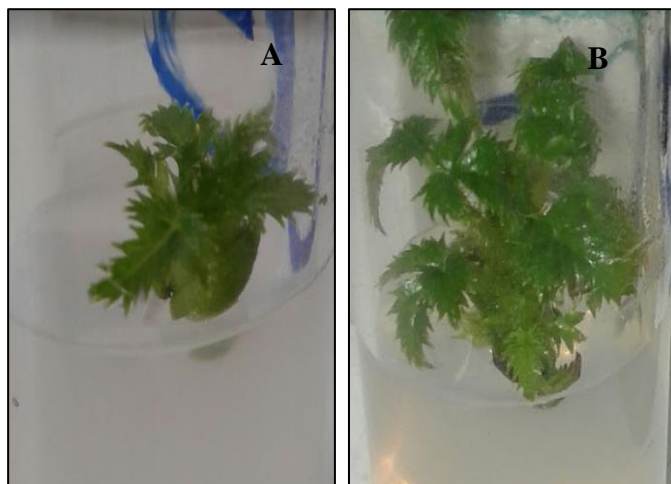
**Figura 19:** A meristemo; B yema



**Figura 20:** Contaminación **A** fúngica; **B** bacteriana en meristemos axilares



**Figura 21:** **A** oxidado muerto, **B** oxidado vivo y **C** no oxidado



**Figura 22:** Vitro plantas **A** medio 1; **B** medio 2



**Figura 23:** Meristemo sembrado en medio basal MS