



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA AGRONOMÍA

**EVALUACIÓN DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA EL
ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE MORA DE CASTILLA (*Rubus
glaucus* Benth) A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA AGRÓNOMA

AUTOR:

ABIGAIL DE LOS ÁNGELES BONILLA ESCOBAR

Riobamba – Ecuador

2023



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA AGRONOMÍA

**EVALUACIÓN DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA EL
ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE MORA DE CASTILLA (*Rubus
glaucus* Benth) A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA AGRÓNOMA

AUTORA: ABIGAIL DE LOS ÁNGELES BONILLA ESCOBAR

DIRECTOR: Ing. PABLO ISRAEL ÁLVAREZ ROMERO PhD

Riobamba – Ecuador

2023

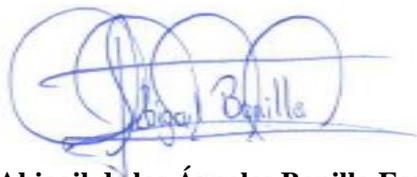
© 2023, Abigail de los Ángeles Bonilla Escobar

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Abigail de los Ángeles Bonilla Escobar, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 22 de mayo de 2023

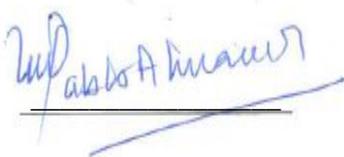
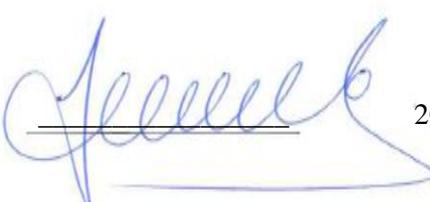
A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Abigail Bonilla', with a large, stylized flourish above it.

Abigail de los Ángeles Bonilla Escobar

1804894549

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA AGRONOMÍA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Proyecto de Investigación **EVALUACIÓN DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA EL ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus Benth*) A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES**, realizado por la señorita: **ABIGAIL DE LOS ÁNGELES BONILLA ESCOBAR**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Víctor Alberto Lindao Córdova PhD PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2023-05-22
Ing. Pablo Israel Álvarez Romero PhD DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-05-22
Ing. Norma Soledad Erazo Sandoval PhD ASESORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-05-22

DEDICATORIA

A Dios, quien como guía estuvo presente en el caminar de mi vida, bendiciéndome y dándome fuerzas para continuar con mis metas. A mi familia por haber sido mi apoyo a lo largo de toda mi carrera universitaria. A mi tía Rubí a quien quiero como a una madre, por su apoyo incondicional, amor y confianza brindada para culminar mi carrera profesional. A mi madre y hermano por que han sido parte de mi motivación para no rendirme. A mis abuelitos Gilberto y Zoila, quienes me criaron como su hija y me animaron en este campo de estudio, desde el cielo me miran cumplir una meta más en mi vida y seguramente están orgullosos de tener una nieta Agrónoma. A mi novio Daniel López quien me acompañó en todo momento, a través de sus consejos, de su amor y paciencia me ayudo a concluir esta meta.

Abigail

AGRADECIMIENTO

A Dios por brindarme salud, fortaleza y capacidad para llegar hasta esta etapa de mi vida. A mi familia, mi tía, madre, hermano, pareja y amigos por estar siempre presentes, por su apoyo incondicional, por animarme durante toda la carrera profesional y quienes colaboraron para la realización de esta investigación al señor Aníbal Altamirano y al Ing. Aníbal Martínez representante del programa de fruticultura de la zona central INIAP. A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y a sus docentes, quienes supieron impartir sus conocimientos y motivaron a desarrollarme como profesional. Al Ing. Pablo Álvarez PhD, quien con su experiencia, conocimiento, correcciones y motivación me oriento en la investigación en su calidad de directo. A la Ing. Norma Erazo PhD, por sus orientaciones y aportes para la ejecución del presente estudio en su calidad de asesor. A la Lic. Ruth Moreno, por su amabilidad, paciencia y consejos que me ha dado a lo largo de mi carrera. Agradezco al Honorable Gobierno Provincial de Tungurahua, a su administrador Ing. Luis Chungata quien me dio la oportunidad de realizar la investigación en el Laboratorio de biotecnología vegetal del CIITAT (Centro de Investigación e Innovación Tecnológica Agropecuaria de Tungurahua). A la Ing. Daniela Recalde, quien desde el primer momento me brindo su amistad, y también estuvo guiándome con su experiencia, consejos y profesionalismo.

Gracias a todos.

Abigail

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xvi
RESUMEN.....	xvii
SUMMARY.....	xviii
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	2
1.1. Planteamiento del problema.....	2
1.2. Objetivos	2
<i>1.2.1. Objetivo General</i>	<i>2</i>
<i>1.2.2. Objetivos Específicos.....</i>	<i>2</i>
1.3. Justificación	2
1.4. Hipótesis.....	3
<i>1.4.1. Nula</i>	<i>3</i>
<i>1.4.2. Alterna</i>	<i>3</i>

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Cultivo in vitro	4
2.2. Medio de cultivo	4
<i>2.2.1. Mecanismo de soporte.....</i>	<i>5</i>
<i>2.2.2. Preparación del medio de cultivo.....</i>	<i>5</i>
<i>2.2.3. Componentes del medio de cultivo</i>	<i>6</i>
<i>2.2.3.1. Agua</i>	<i>7</i>
<i>2.2.3.2. Carbohidratos.....</i>	<i>8</i>
<i>2.2.3.3. Vitaminas.....</i>	<i>8</i>
<i>2.2.3.4. Reguladores de crecimiento.....</i>	<i>10</i>
<i>2.2.3.5. Macronutrientes</i>	<i>11</i>
<i>2.2.3.6. Micronutrientes.....</i>	<i>11</i>

2.2.3.7.	Agentes solidificantes	11
2.2.3.8.	Carbón activado	12
2.3.	Etapas del cultivo <i>in vitro</i>	12
2.3.1.	<i>Selección del explante</i>	12
2.3.2.	<i>Desinfección</i>	12
2.3.3.	<i>Establecimiento <i>in vitro</i></i>	12
2.4.	Metodología de establecimiento <i>in vitro</i> de la mora de castilla	13
2.4.1.	<i>Multiplicación</i>	13
2.5.	Metodología de la multiplicación <i>in vitro</i> de la mora de castilla	13
2.5.1.	<i>Protocolos</i>	14
2.6.	Cultivo de Mora de castilla	14
2.6.1.	<i>Generalidades</i>	14
2.6.2.	<i>Taxonomía</i>	15
2.6.3.	<i>Descripción Botánica</i>	15
2.6.4.	<i>Importancia de la variedad</i>	16

CAPITULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	17
3.1.	Características del lugar	17
3.1.1.	<i>Localización</i>	17
3.1.2.	<i>Ubicación geográfica</i>	18
3.1.3.	<i>Condiciones del laboratorio</i>	18
3.2.	Materiales y equipos	18
3.2.1.	<i>De escritorio</i>	18
3.2.2.	<i>De laboratorio</i>	19
3.2.2.1.	Materiales	19
3.2.2.2.	Materiales de desinfección	19
3.2.2.3.	Reactivos	20
3.2.2.4.	Equipos	20
3.2.2.5.	Instrumentos y procesos	20
3.3.	Metodología	21
3.3.1.	<i>Selección del material vegetal</i>	21
3.3.2.	<i>Protocolos</i>	21
3.3.2.1.	Protocolo 1	21
3.3.2.2.	Protocolo 2	24

3.3.2.3.	Protocolo 3.....	25
3.3.3.	<i>Establecimiento del material vegetal in vitro</i>	27
3.3.4.	<i>Establecimiento de explantes o cultivo de primeras yemas</i>	28
3.3.4.1.	Clonación.....	28
3.4.	Variables y métodos de evaluación <i>in vitro</i>	28
3.4.1.	<i>Porcentaje de contaminación</i>	28
3.4.2.	<i>Niveles de oxidación</i>	28
3.4.3.	<i>Tiempo de brotación</i>	29
3.4.4.	<i>Número de brotes</i>	29
3.4.5.	<i>Altura de los brotes</i>	29
3.4.6.	<i>Número de brotes para multiplicar</i>	29
3.4.7.	<i>Altura de las primeras yemas multiplicadas</i>	29
3.5.	Registro de datos	30
3.6.	Análisis de datos	30

CAPITULO IV

4.	MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	31
4.1.	Porcentaje de contaminación	31
4.2.	Oxidación	35
4.3.	Tiempo de brotación	38
4.4.	Número de brotes	40
4.5.	Altura de los brotes	42
4.6.	Número de segmentos nodales brotados para la multiplicación	45
4.7.	Altura de las primeras yemas multiplicadas	46
4.8.	Discusión	48

CAPÍTULO V

5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
5.1.	Conclusiones	53
5.2.	Recomendaciones	54

GLOSARIO

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2:	Tiempos de esterilización en autoclave de acuerdo con la cantidad de medio en el recipiente.	6
Tabla 2-2:	Composición general para medios de cultivo <i>in vitro</i>	7
Tabla 3-2:	Composición general para medios de cultivo <i>in vitro</i>	15
Tabla 3-3:	Desinfección en campo, desinfección en el laboratorio dentro de la cámara de flujo y preparación de medio de cultivo para establecimiento y multiplicación.....	27
Tabla 4-3:	Porcentaje de oxidación.....	29
Tabla 5-4:	Análisis de varianza de la contaminación asociada a segmentos nodales de <i>Rubus glaucus</i> Benth, luego del establecimiento <i>in vitro</i> en el laboratorio a los 8 días.	32
Tabla 6-4:	Análisis de varianza de la contaminación asociada a segmentos nodales de <i>Rubus glaucus</i> Benth, luego del establecimiento <i>in vitro</i> en el laboratorio a los 16 días.	33
Tabla 7-4:	Análisis de varianza de la contaminación asociada a segmentos nodales de <i>Rubus glaucus</i> Benth, luego del proceso de desinfección durante el establecimiento en laboratorio a los 24 días.....	33
Tabla 8-4:	Análisis de varianza de la contaminación asociada a segmentos nodales de <i>Rubus glaucus</i> Benth, luego del establecimiento <i>in vitro</i> en el laboratorio a los 32 días.	34
Tabla 9-4:	Análisis de varianza de la contaminación asociada a segmentos nodales de <i>Rubus glaucus</i> Benth, luego del establecimiento <i>in vitro</i> en el laboratorio a los 40 días.	34
Tabla 10-4:	Análisis de varianza de la oxidación asociada a segmentos nodales de <i>Rubus glaucus</i> Benth, luego del establecimiento <i>in vitro</i> en el laboratorio a los 8 días.	36
Tabla 11-4:	Análisis de varianza de la oxidación asociada a segmentos nodales de <i>Rubus glaucus</i> Benth, luego del establecimiento <i>in vitro</i> en el laboratorio a los 16 días.	36
Tabla 12-4:	Análisis de varianza de la oxidación asociada a segmentos nodales de <i>Rubus glaucus</i> Benth, luego del establecimiento <i>in vitro</i> en el laboratorio a los 24 días.	37

Tabla 13-4:	Análisis de varianza de la oxidación asociada a segmentos nodales de <i>Rubus glaucus</i> Benth, luego del establecimiento <i>in vitro</i> en el laboratorio a los 32 días.	37
Tabla 14-4:	Test de Tukey al 5% de la oxidación asociada a segmentos nodales de <i>Rubus glaucus</i> Benth, luego del establecimiento <i>in vitro</i> en el laboratorio a los 32 días.	37
Tabla 15-4:	Análisis de varianza de la oxidación asociada a segmentos nodales de <i>Rubus glaucus</i> Benth, luego del establecimiento <i>in vitro</i> en el laboratorio a los 40 días.	38
Tabla 16-4:	Análisis de varianza del tiempo de brotación asociada a segmentos nodales de <i>Rubus glaucus</i> Benth, luego del establecimiento <i>in vitro</i> en laboratorio observados todos los días.	39
Tabla 17-4:	Análisis de varianza del número de brotes asociados a segmentos nodales de <i>Rubus glaucus</i> Benth, luego del establecimiento <i>in vitro</i> en el laboratorio a los 15 días.	41
Tabla 18-4:	Análisis de varianza del número de brotes asociados a segmentos nodales de <i>Rubus glaucus</i> Benth, luego del establecimiento <i>in vitro</i> en el laboratorio a los 30 días.	41
Tabla 19-4:	Análisis de varianza del número de brotes asociados a segmentos nodales de <i>Rubus glaucus</i> Benth, luego del establecimiento <i>in vitro</i> en el laboratorio a los 45 días.	42
Tabla 20-4:	Análisis de varianza de la altura de los brotes asociadas a segmentos nodales de <i>Rubus glaucus</i> Benth, luego del establecimiento <i>in vitro</i> en el laboratorio a los 15 días.	43
Tabla 21-4:	Análisis de varianza de la altura de los brotes asociados a segmentos nodales de <i>Rubus glaucus</i> Benth, luego del establecimiento <i>in vitro</i> en el laboratorio a los 30 días.	44
Tabla 22-4:	Análisis de varianza de la altura de los brotes asociadas a segmentos nodales de <i>Rubus glaucus</i> Benth, luego del establecimiento <i>in vitro</i> en el laboratorio a los 45 días.	44
Tabla 23-4:	Análisis de varianza del número de segmentos nodales brotados para sus multiplicaciones, asociadas a segmentos nodales de <i>Rubus glaucus</i> Benth, luego del proceso de la multiplicación <i>in vitro</i>	46
Tabla 24-4:	Análisis de varianza de las alturas de las primeras yemas multiplicadas de <i>Rubus glaucus</i> Benth, luego de la multiplicación <i>in vitro</i> en el laboratorio a los 15 días.	47

Tabla 25-4:	Test de Tukey al 5% de las alturas de las primeras yemas multiplicadas a los 15 días de <i>Rubus glaucus</i> Benth, luego del proceso de multiplicación <i>in vitro</i> en el laboratorio.	48
--------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-3:	Ubicación del laboratorio de Biotecnología Vegetal CIITAT y las plantas madre de la mora de castilla.	17
Ilustración 2-3:	Ubicación de las plantas madre de la mora de castilla en la propiedad del Señor Aníbal Altamirano.....	17
Ilustración 3-3:	Desinfección de las plantas madre en campo y recolección de estacas (A) Aplicación fitosanitaria en las plantas de mora de castilla ubicadas en la granja Píllaro-INIAP (B) Aplicación fitosanitaria en las plantas de mora de castilla ubicadas en la propiedad del señor Aníbal Altamirano.	22
Ilustración 4-3:	Desinfección de las plantas madre en campo y recolección de estacas (A) Desinfección de la tijera con alcohol al 70% (B) se cortaron explantes de 40 cm de longitud (C) se colocó los explantes dentro de bolsas de plástico. .	22
Ilustración 5-3:	Desinfección de las plantas madre en campo y recolección de estacas (A) Se deshojó de los explantes (B) se lavó el explante con la ayuda de un cepillo dental y jabón neutro (C) se cortó los explantes para colocarlos dentro de los frascos.....	23
Ilustración 6-3:	Desinfección de las plantas madre en campo y recolección de estacas (A) Explantes sumergidos en los fungicidas (B) Explantes enjuagados.	23
Ilustración 7-3:	Desinfección en el laboratorio dentro de la cámara de flujo (A) Materiales de desinfección (cloro 1%), (alcohol 70%), (agua destilada) (B) Segmentos nodales sumergidos en alcohol al 70% en diferentes tiempos y en cloro al 1% en diferentes tiempos.....	24
Ilustración 8-4:	Contaminación asociada a segmentos nodales de <i>Rubus glaucos</i> Benth, luego del proceso de desinfección durante el establecimiento en laboratorio. (A) Hongo, (a) micelio de color blanco (B) Bacteria, (b) capa brillante de color café claro.	31
Ilustración 9-4:	Porcentaje de contaminación a los 8, 16, 24, 32 y 40 días de cada tratamiento.....	32
Ilustración 11-4:	Porcentaje de oxidación a los 8, 16, 24, 32 y 40 días de cada tratamiento.	35
Ilustración 12-4:	Segmento nodal brotación tomado mediante de la observación todos los días.....	38
Ilustración 13-4:	Tiempo de brotación de los segmentos nodales, observado todos los días de cada tratamiento.....	39

Ilustración 14-4:	Número de brotes (a) Brotes a los 15 días, (b) Brotes a los 30 días, (c) Brotes a los 45 días.	40
Ilustración 15-4:	Número de brotes de los segmentos nodales a los 15, 30 y 45 días de cada tratamiento.	40
Ilustración 16-4:	Alturas de los brotes (a) altura a los 15 días, (b) altura a los 30 días, (c) altura a los 45 días.	42
Ilustración 17-4:	Altura de los brotes a los 15, 20 y 45 días de cada tratamiento.	43
Ilustración 18-4:	Numero de segmentos nodales brotados para sus multiplicaciones de cada tratamiento.	45
Ilustración 18-4:	Numero de segmentos nodales brotados para sus multiplicaciones de cada tratamiento.	45
Ilustración 20-4:	Alturas de los brotes multiplicados a los 15 días de cada tratamiento.....	47

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

mL:	Mililitro
BAP:	6- Bencilaminopurina
IBA:	Ácido Indol butírico
GA3:	Ácido Giberélico
MS:	Murashige and Skoog basal Salt Mixture
NaOH:	Hidróxido de sodio
pH:	Potencial hidrógeno
min:	Minutos
msnm:	Metros sobre el nivel del mar
°C:	Grado Celsius
g/L:	Gramos por litro
cm:	Centímetro
mL/L:	Mililitro por litro
mm:	Milímetro
ppm:	Partes por millón
cc/L:	Centímetros cubico por litro

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** COMPOSICIÓN DEL MEDIO BASE MURASHIGE Y SKOOG (año 1962)
- ANEXO B:** PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA ESTABLECIMIENTO
Y MULTIPLICACIÓN
- ANEXO C:** ESTABLECIMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL IN VITRO
- ANEXO D:** ALTURA DE LOS BROTES
- ANEXO E:** MULTIPLICACIÓN

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar los diferentes protocolos para el establecimiento *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) a partir de segmentos nodales, para lo cual se plantearon tres tratamientos (protocolos), con tres repeticiones, los cuales consistieron: T1 (Protocolo 1): alcohol al 70% por 1 min, hipoclorito de sodio al 1% por 10 min. El T2 (Protocolo 2): alcohol al 70% por 30 s, hipoclorito de sodio al 1% por 5 min. El T3 (Protocolo 3): alcohol al 70% por 3 min, hipoclorito de sodio al 1% por 15 min. Después de la desinfección, los segmentos nodales fueron colocados en tubos de ensayo con un medio de cultivo estándar (pH 5,5) que contenían hormonas y vitaminas. Después de 45 días, se utilizaron las yemas brotadas de los segmentos nodales para la multiplicación. Se prepararon medios de cultivos estándar con tres concentraciones diferentes de hormonas y vitaminas: T1 (protocolo 1) pantetonato 0,6 ppm, IBA 0,3 ppm, BAP 1 ppm, GA3 1 ppm, T2 (protocolo 2) pantetonato 1ppm, IBA 0,1 ppm, BAP 0,5 ppm, GA3 0,5 ppm, T3 (protocolo 3) pantetonato 0,2ppm, IBA 0,5 ppm, BAP 1,5 ppm, GA3 1,5 ppm. Los resultados obtenidos mostraron que el T1 (Protocolo 1) tuvo un menor nivel de oxidación a los 32 días, con una media de 1,36 y las mayores alturas de las primeras yemas multiplicadas, fue el T1(protocolo 1) con una media de 0,6. Se concluye que el T1 (protocolo 1) es el más adecuado para el establecimiento *in vitro* de mora de Castilla y el mismo tuvo mayor efecto en desarrollo de los explantes. Se recomienda utilizar el protocolo 1 para el establecimiento *in vitro* de mora de castilla a partir de segmentos nodales.

Palabras clave: <ESTABLECIMIENTO *IN VITRO*>, < MORA (*Rubus glaucus* Benth) >, < SEGMENTOS NODALES >, < MULTIPLICACIÓN>, < DESINFECCIÓN EXPLANTES>, <OXIDACIÓN >, <HORMONAS>, <PROTOCOLOS>.



D.B.R.A.I.
Ing. Cesarín Castillo



1107-DBRA-UPT-2023

SUMMARY

This research aimed to evaluate the different protocols for the in vitro establishment of *Castilla* mulberry (*Rubus glaucus* Benth) from nodal segments, for which three treatments (protocols) were proposed with three replications consisting on T1 (Protocol 1): 70% alcohol for 1 min, 1% sodium hypochlorite for 10 min, T2 (Protocol 2): 70% alcohol for 30 s, 1% sodium hypochlorite for 5 min, T3 (Protocol 3): 70% alcohol for 30 s, 1% sodium hypochlorite for 5 min, T4 (Protocol 4): 70% alcohol for 30 s, 1% sodium hypochlorite for 5 min. T2 (Protocol 2): 70% alcohol for 30 s, 1% sodium hypochlorite for 5 min. T3 (Protocol 3): 70% alcohol for 3 min, 1% sodium hypochlorite for 15 min. After disinfection, nodal segments were placed in test tubes with standard culture medium (pH 5.5) containing hormones and vitamins. After 45 days, buds sprouted from the nodal segments were used for multiplication. Standard culture media were prepared with three different concentrations of hormones and vitamins: T1 (protocol 1) pantothenate 0.6ppm, IBA 0.3ppm, BAP 1ppm, GA3 1ppm, T2 (protocol 2) pantothenate 1ppm, IBA 0.1ppm, BAP 0.5ppm, GA3 0.5ppm, T3 (protocol 3) pantothenate 0.2ppm, IBA 0.5ppm, BAP 1.5ppm, GA3 1.5ppm. The results obtained showed that T1 (protocol 1) had a lower level of oxidation at 32 days with a mean of 1.36 and the highest heights of the first multiplied buds was T1 (protocol 1) with a mean of 0.6. It is concluded that T1 (protocol 1) is the most suitable for the in vitro establishment of mulberry and had the greatest effect on explant development. It is recommended to use protocol 1 for in vitro establishment of mulberry from nodal segments.

Keywords: <IN VITRO ESTABLISHMENT>, <CASTILLA MULBERRY (*Rubus glaucus* Benth) >, <NODAL SEGMENTS>, <MULTIPLICATION>, <EXPLANT DISINFECTION>, <OXIDATION>, <HORMONES>, <PROTOCOLS>.



Esthela Isabel Colcha Guashpa

0603020678

INTRODUCCIÓN

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) es una fruta muy apetecida en el mercado nacional e internacional, es rica en vitaminas y minerales que contribuyen al bienestar de las personas, es por ello que al tener un buen manejo fitosanitario con el tiempo será una fruta de exportación que podría enviarse congelada o fresca para su consumo.

En el Ecuador, la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) se cultiva en las provincias de Tungurahua, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Imbabura y Carchi (Iza et al., 2020, p. 53). Representa un aporte económico muy importante para las familias agricultoras, se puede cosechar una vez a la semana dependiendo del manejo del cultivo y su consumo se duplica o triplica especialmente en la época de los Finados ya que es una fruta esencial para la preparación de la colada morada. En nuestro país existen 5247 ha cultivadas, en 14546 unidades de producción, por lo que el incremento nacional es del 19%, lo que indica que se encuentra en manos de pequeños productores, alrededor de un tercio de hectárea por productor, cada planta bien manejada por el agricultor puede llegar a producir 12 kg/planta/año (Martínez et al., 2019, p. 1).

La propagación de esta fruta puede ser de dos formas, sexual la cual no es muy recomendada ya que en cada fruto existe baja cantidad de semillas fértiles, además es largo su periodo de germinación y de lento desarrollo de las plántulas. De forma asexual el material debe ser proveniente de plantas sanas y vigorosas, lo que permite que se conserve las mejores características de la planta madre, pero presenta inconvenientes ya que existe rápida diseminación de enfermedades y variabilidad genética (Villalba et al., 2020, p.4).

La técnica del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* constituye una alternativa con mayor ventaja ya que se puede contar con plantas limpias y propagadas rápidamente, los protocolos para el establecimiento *in vitro* son claves esenciales para obtener plantas de buena calidad, libres de enfermedades (Hernández et al., 2017, p. 3).

Por lo antes expuesto, el objetivo de este trabajo de investigación, es evaluar los diferentes protocolos para el establecimiento *in vitro* de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) a partir de segmentos nodales, las plantas de mora por el método *in vitro* se obtendrán en un tiempo menor al que se produce tradicionalmente, estos protocolos contribuirán a obtener buenos ejemplares para mejorar la economía de los agricultores que se dedican a la producción de esta fruta y por ende su calidad de vida.

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del problema

Existe un desconocimiento de protocolos para el establecimiento *in vitro* de mora de castilla en el Ecuador, por esta razón se pretende estudiar algunos protocolos para obtener plantas de mora de castilla con buenas características agronómicas.

En el Ecuador la mora se ha convertido en un frutal de alta demanda, ya que al realizar la propagación de forma tradicional no se garantiza la sanidad de los cultivares, es por esta razón que se necesita realizar la reproducción de manera asexual para obtener plantas uniformes, con características más similares a la planta madre, además se cultiva un gran número de plantas en un espacio (área) pequeño, libres de contaminación y en el menor tiempo posible.

1.2. Objetivos

1.2.1. *Objetivo General*

Evaluar diferentes protocolos para el establecimiento *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) a partir de segmentos nodales.

1.2.2. *Objetivos Específicos*

- Determinar el protocolo más adecuado para el establecimiento *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth).
- Evaluar el efecto de los protocolos en el desarrollo de segmentos nodales de la mora castilla (*Rubus glaucus* Benth).

1.3. Justificación

Con el pasar del tiempo se ha visto que la propagación tradicional ha sido de poco interés ya que el tiempo en que se demora en salir nuevas plantas es muy lento y existe el riesgo de que presenten enfermedades, plantas irregulares y con escasa viabilidad, es por ello que viendo la necesidad de obtener plantas de mora de castilla en un tiempo corto, con características propias de la planta

madre y libres de enfermedades, se propone desarrollar técnicas de laboratorio actualizadas como son los protocolos para el establecimiento *in vitro*, de esta manera se asegura que las plantas sean sanas, el tiempo que salen es rápido, y se puede obtener una gran cantidad de plantas, entonces con la presente investigación se pretende determinar cuál de los diferentes protocolos va a tener efecto en el establecimiento *in vitro* de la mora de castilla a partir de segmentos nodales.

1.4. Hipótesis

1.4.1. Nula

H₀: Ninguno de los protocolos permite el establecimiento *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) a partir de segmentos nodales.

1.4.2. Alterna

H₁: Al menos uno de los protocolos permite el establecimiento *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) a partir de segmentos nodales.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Cultivo *in vitro*

El cultivo de plantas *in vitro*, o cultivo de tejidos vegetales, es un conjunto de técnicas que consisten en el aislamiento de partes de una planta, que a su vez pueden ser hojas, raíces, tallos, etc., para su posterior cultivo en un medio artificial, procedimiento realizado en un laboratorio que permite el control de las características del entorno receptor de la planta, como la temperatura, la humedad y la intensidad de la luz para reproducir o propagar especies de plantas con las características deseadas (Garzón et al., 2018, p. 6)

Este método de cultivo es una de las técnicas básicas para aprovechar la totipotencia natural de las células vegetales en biotecnología vegetal, pero presenta el inconveniente de la contaminación tanto endógena como exógena. Entre todos los métodos de cultivo *in vitro*, el uso del cultivo *in vitro* de segmentos nodales (CSN) y ápices de vástago se utilizan para inducir la ramificación como método para propagar y obtener clones (Socorro et al., 2021, p. 7). El cultivo de meristemas se ha convertido en una de las técnicas estándar debido a su amplia gama de aplicaciones, siendo de interés al obtener plantas libres de patógenos y la capacidad de proliferación de las plantas (Vivek, M. et al., 2018, citado en Martínez, 2020, p.17-18).

2.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo es un elemento de la técnica de cultivo *in vitro* que funciona a la vez como sustrato y fuente energética para el desarrollo de los tejidos. Además, son una combinación de diferentes componentes, los cuales varían proporcionalmente de acuerdo con las características del tejido a desarrollar como callo, porciones de hoja, células, porciones de tallo, etc. y el proceso morfogénico que se desea seguir el cultivo de meristemas, organogénesis, embriogénesis somática, etc (Gamborg y Shuluk, 1981, citado en Suárez, 2020, p.41).

Medios que son utilizados con frecuencia en el cultivo *in vitro* de plantas leñosas son los de sales basales Murashige y Skoog (MS) con agar y el medio orgánico mínimo MS con agar y sacarosa. Para el cultivo de células y protoplastos y en la regeneración de plantas, ya que es muy utilizado el medio (B5) marca la diferencia con el medio MS, aunque el B5 posee una mayor concentración

de sales en general, es por ello que se conoce como el medio de sales mayores (López et al., 2005; citado en Cavazos, 2017, p. 24).

Antes de realizar la asepsia del material vegetal que se va a introducir *in vitro*, es necesario disponer de medios de cultivos esterilizados y dosificados en recipientes adecuados, ya que una parte importante del cultivo *in vitro* son los medios de cultivo, la razón por la cual ellos en ellos se encuentran las sustancias necesarias para el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales (Galliani, 2020, p. 4).

2.2.1. Mecanismo de soporte

La consistencia del medio tiene dos estados dependiendo de la presencia o ausencia de un medio de soporte. Los medios líquidos suelen estar formados únicamente por medios disueltos en agua, sin ningún medio, alcanzan una cierta dureza proporcionada por el gelificante (Suárez, 2020, p.49).

Agar: Es el agente gelificante más utilizado porque su rigidez mantiene el cultivo en su lugar y su inercia iónica permite que los nutrientes fluyan del medio al tejido. Estructuralmente, el agar es una mezcla compleja de polisacáridos extraídos de algas rojas, disueltos a 100 °C y solidificados a 45 °C, que no es digerido por enzimas vegetales y no reacciona con los componentes del medio (Suárez, 2020, p.49).

Phytigel: Es un polímero producido por la fermentación de la bacteria "*Pseudomonas elodea*". Contiene naturalmente altas cantidades de potasio, sodio, calcio y magnesio, aunque es inofensivo y generalmente más puro que el agar. Aplicar 0,2% a 0,4% (2 a 4 g L⁻¹) (Suárez, 2020, p.50).

2.2.2. Preparación del medio de cultivo

De acuerdo con Suárez (2020, p.54) el proceso de preparación de un medio de cultivo se efectúa en una serie de pasos, que deben terminar en la obtención de una formulación con los componentes en la proporción adecuada, el pH óptimo, la consistencia deseada, estéril y distribuido en las cantidades requeridas. Los pasos por seguir para la preparación de un litro de medio de cultivo son los siguientes:

Adición de los componentes: Diluir en una cantidad de agua pura (500 mL para 1 L de medio) las soluciones stock, el azúcar, el mio-inositol, la tiamina y los reguladores va de acuerdo con lo requerido, luego de ello se afora con agua pura hasta completar 900 mL (Suárez, 2020, p.54).

Medición y ajuste de pH: El pH del medio es importante para la solubilidad de las sales, asimilación de los reguladores de crecimiento y la rigidez del medio. La medición y el ajuste de *pH* se debe realizar antes de la esterilización del medio, y se verificarse agregando HCl o KOH para disminuir o aumentar su valor, respectivamente. Aunque el pH del medio puede oscilar entre 4,5 a 6,0, este se ajusta a un valor de 5,7 con el fin de que al ser esterilizado disminuya a su valor óptimo para la toma de nutrientes por los tejidos vegetales (Suárez, 2020, p.54).

Adición de agar: Al preparar medios de consistencia semi sólida, por lo general el agar debe ser agregado y mezclado después de la medición del pH, ya que su adición previa puede dañar el potenciómetro (Suárez, 2020, p.54).

Esterilización: Generalmente, el medio con todos sus componentes se esteriliza en una autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión de 1,05 kg.cm⁻², y el tiempo de esterilización, depende de la cantidad de medio que se tenga en el recipiente (Tabla 1-2) (Suárez, 2020, p.54).

Tabla 1-2: Tiempos de esterilización en autoclave de acuerdo con la cantidad de medio en el recipiente.

Volumen de medio (mL)	Tiempo mínimo de esterilización (min)
20-50	15
75	20
250-500	25
1000	30
1500	35
2000	40

Fuente: Suárez, 2020, p.54.

Realizado por: Bonilla, A, 2023

2.2.3. Componentes del medio de cultivo

De acuerdo con Boeri (2015), citado en Carreto (2017, p.23) la composición del medio proporciona suministro de nutrientes a los tejidos vegetales *in vitro* y debe coincidir estrechamente con las condiciones nutricionales que el suelo proporciona a las plantas en su estado natural. Los principales componentes del medio son: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares, sustancias gelificantes y hormonas o reguladores del crecimiento vegetal.

Tabla 2-2: Composición general para medios de cultivo in vitro.

Compuestos	Composición
Agua	
Compuestos orgánicos	Suplementos macroorgánicos: Carbohidratos Suplementos microinorgánicos Vitaminas Aminoácidos Reguladores de crecimiento: Auxinas, citocininas, giberelinas, brasinoesteroides y etileno Antibióticos
Compuestos inorgánicos	Macronutrientes Micronutrientes
Compuestos indefinidos	Agua de coco Extractos de levadura Caseína hidrolizada Agentes solidificantes Carbón activado

Fuente: Carreto, 2017, p.23.

Realizado por: Bonilla, A, 2023

2.2.3.1. Agua

Generalmente se utiliza agua destilada. El agua se puede utilizar bajo ciertas condiciones, pero debe evitarse porque algunos cationes como Ca^{2+} o Mg^{2+} se pueden combinar con otros componentes de medios como los fosfatos, especialmente durante la esterilización (Boeri, 2015, citado en Carreto, 2017, p 23).

2.2.3.2. Carbohidratos

Las plantas producen naturalmente su propia fuente de energía, pero *in vitro*, en ausencia de fotosíntesis, los organismos vegetales requieren una fuente externa de carbohidratos para crecer y desarrollarse como heterótrofos, por lo que la mayoría de los medios deben complementarse con fuentes de energía (Suárez, 2020, p.45).

Según Suárez (2020, p.46) menciona las fuentes más comunes de carbohidratos *in vitro* son:

Sacarosa: Es un disacárido compuesto por fructosa y glucosa ($C_{12}H_{22}O_{12}$) y se usa comúnmente en preparaciones de medios. Se suele añadir al medio de cultivo como azúcar normal y casi siempre en una concentración del 2% al 4% (Suárez, 2020, p.46).

D-manitol: Es un azúcar utilizado para regular el potencial osmótico del medio de cultivo. A menudo se utiliza en el aislamiento y cultivo de protoplastos (Suárez, 2020, p.45).

D-sorbitol: No se suele utilizar como fuente de energía, pero tiene la particularidad de ser transportado por el floema (Suárez, 2020, p.45).

2.2.3.3. Vitaminas

Las vitaminas son complejos necesarios para el correcto desarrollo celular en los tejidos vegetales. Las plantas suelen sintetizar varias vitaminas porque las utilizan para el crecimiento y la diferenciación celular y actúan como catalizadores; cuando los tejidos vegetales se cultivan *in vitro*, la deficiencia de vitaminas puede ser un factor limitante en su desarrollo (Sharry, Adema, & Abedini, 2025, citado en Álvarez et al, 2021, p. 13).

Las más comúnmente añadidas en el medio de cultivo son: clorhidrato de tiamina, niacina, clorhidrato de piridoxina, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico y riboflavina. En general, los requerimientos biológicos de vitaminas se cubren mediante la suplementación externa, aunque algunos tejidos pueden obtenerlas a partir de complejos orgánicos de diversa composición, como agua de coco, extracto de levadura, zumo de frutas, etc (Sharry, et al, 2015, p. 49).

De acuerdo con Suárez (2020, p.46-47) las vitaminas importantes en el medio de cultivo.

Tiamina conocida como vitamina B1): Es un cofactor el cual actúa en el ciclo de los ácidos orgánicos de la respiración (Ciclo de Krebs) y es un componente regular de la mayoría de los medios de cultivo (Suárez, 2020, p.46-47).

Acido nicotínico (niacina o vitamina B3): Es un componente de las enzimas que actúan en las reacciones activadas por la luz. Su uso es menos común que la tiamina (Suárez, 2020, p.46-47).

Mio-inositol: Es un constituyente del complejo B de vitaminas y componente regular de todos los medios de cultivo. Aunque no es estrictamente necesario para los procesos de crecimiento y desarrollo, los cultivos tienen un mejor comportamiento en presencia de éste (Suárez, 2020, p.46-47).

Ácido Ascórbico (vitamina C): Es usado más frecuentemente como un antioxidante en cultivos de tejidos de especies que producen grandes cantidades de fenoles *in vitro* (Suárez, 2020, p.46-47).

Según Sharry et al (2015, p. 50-51) menciona otras vitaminas utilizadas en los medios de cultivo.

Acido pantoténico (vitamina B5): Es termoestable, es por ello que puede ser autoclavado junto con el medio nutritivo. Además, se encuentra en la naturaleza como componente de la coenzima A. Actúa en el metabolismo de las grasas. No es una vitamina esencial y se incorpora al medio en forma de pantotenato de calcio (Sharry et al., 2015, p. 50-51).

Piridoxina (vitamina B6): Es termo y fotoestable. Aunque no es considerada esencial en el cultivo de tejidos, ya que participa en la síntesis de purinas y pirimidinas y, por lo tanto, en el metabolismo de los ácidos nucleicos. Además, estimula el crecimiento vegetal interviniendo en las reacciones de energía (Sharry et al., 2015, p. 50-51).

Niacina (vitamina B3): desempeña un papel fundamental en la respiración porque es un componente de las coenzimas I y II, grupos portadores de hidrógeno en la fase respiratoria de deshidrogenación (Sharry et al., 2015, p. 50-51).

Tocoferol (vitamina E): Mejora y promueve la dispersión de cultivos en suspensión (Sharry et al., 2015, p. 50-51).

Biotina (vitamina H): No es esencial. La biotina sirve como factor de crecimiento de las levaduras y algunas bacterias. Además, es utilizada en el metabolismo de grasas, proteínas y carbohidratos (Sharry et al., 2015, p. 50-51).

Ácido fólico (vitamina Bc o M): No es esencial y se descompone con el calor en soluciones ácidas. Cumple funciones de vitamina B y tiene actividad de coenzima. Además, en la oscuridad inhibe el crecimiento de los tejidos, mientras que en la luz lo promueve (Sharry et al., 2015, p. 49).

2.2.3.4. *Reguladores de crecimiento*

El funcionamiento de los organismos pluricelulares requiere mecanismos reguladores capaces de coordinar la actividad de células, tejidos y órganos. Así, las fitohormonas, hormonas vegetales o reguladores del crecimiento vegetal son moléculas orgánicas producidas por las células vegetales en muy bajas concentraciones internas y en puntos específicos, cuya función es modular los fenómenos fisiológicos de las plantas y las respuestas a estímulos como la exposición y el cambio. Luz, temperatura y humedad y causan o inducen la expresión morfogénica (Ribón et al., 2020, p. 30).

Según Sharry et al (2015, p. 53-55) menciona que los reguladores de crecimiento se dividen en auxinas, citocininas, giberelinas y retardantes e inhibidores del crecimiento. Son naturales conocidas como hormonas o sintéticas como reguladores de crecimiento.

Auxinas: Las auxinas estimulan el agrandamiento y alargamiento celular y promueve la división celular en el cultivo de tejidos. Se agregan en una mezcla con citoquininas en la etapa proliferativa o no en la etapa de raíz. También son esenciales para la supervivencia de las plantas porque su estructura química es muy variable y pueden acumularse en formas inactivas asociadas a oligosacáridos y aminoácidos (Sharry et al., 2015, p. 53-55).

Citocininas: Se utilizan para estimular la división celular, principalmente uniéndose a la auxina. En altas concentraciones, inducen la formación de yemas adventicias e inhiben la formación de raíces al reducir la dominancia apical, promoviendo la proliferación de tallos y la proliferación de yemas laterales. Por otro lado, las citoquininas pueden ralentizar el proceso de senescencia celular y afectar el transporte de auxinas. Sin embargo, aunque algunos tipos de tejidos requieren principalmente citoquininas para la organogénesis, no son necesarias (Sharry et al., 2015, p. 53-55).

Giberelinas: Están presentes de forma natural en las plantas y provocan elongación de las células, la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemas. También afectan la latencia

de embriones o semillas aisladas. Generalmente inhiben la formación de brotes y raíces adventicias. De todas las giberelinas, el ácido giberélico (AG3) es el más utilizado para la propagación *in vitro* (Sharry et al., 2015, p. 53-55).

Brasinoesteroides (BR): Los brasinoesteroides más ampliamente distribuidos en las plantas son los que poseen 28 átomos de carbono (C28), grupo en que la brasinólida es el representante más activo. En los primeros momentos del descubrimiento, las BR no eran ampliamente reconocidas como hormonas esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, por lo que su acción es similar a la de otras fitohormonas (Sharry et al., 2015, p. 53-55)

2.2.3.5. *Macronutrientes*

Son elementos esenciales que las plantas necesitan en gramos por litro (C, H, N, O, S, Mg, Ca, K, P). Quizás los requerimientos minerales más evidentes sean el fósforo necesario para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos, el azufre (aminoácidos, cisteína y metionina) o el nitrógeno el cual es el segundo elemento después del carbono entre los elementos que componen las células. Aunque se pueden usar fuentes orgánicas, generalmente se usa fosfato para la fuente de fósforo, sulfato para la fuente de azufre y nitrato o sal de amonio para la fuente de nitrógeno (Boeri, 2015, citado en Carreto, 2017, p. 25).

2.2.3.6. *Micronutrientes*

Son aquellos nutrientes que en pequeñas cantidades son necesarios, elementos que la planta requiere en cantidades del orden de mg/litro (Fe, Mo, Ni, Cu, Zn, Mn, B). Son esenciales para el funcionamiento de varias enzimas y deben estar incluidos en el medio de cultivo (Boeri, 2015, citado en Carreto, 2017, p. 26).

2.2.3.7. *Agentes solidificantes*

Dependiendo de las necesidades de cada planta, se puede preparar un medio sólido o semisólido utilizando agentes gelificantes que ayuden a mantener el crecimiento del tejido en condiciones estáticas. Es importante tener en cuenta la pureza del agar, ya que a veces se producen otros tipos de contaminación. La marca y la concentración utilizadas pueden causar una respuesta *in vitro* diferente a la prevista (Roca & Mroginski, 1993, citado en Solís, 2019, p. 6-7).

2.2.3.8. Carbón activado

Es un material poroso e insípido que se distingue del carbón elemental por la eliminación de todas las impurezas que no son de carbón y la oxidación superficial del carbón. Es un componente importante de muchos medios de cultivo de tejidos vegetales, ya que previene el oscurecimiento de los tejidos y los medios de cultivo mediante la absorción de compuestos tóxicos como los polifenoles liberados de los tejidos de cultivo (Chuchut & Murillo, 2019, p. 1618).

2.3. Etapas del cultivo *in vitro*

2.3.1. Selección del explante

Para poder establecer el cultivo en condiciones estériles, es necesario obtener explantes con suficientes niveles de nutrientes y etapa de desarrollo. Para obtener estos explantes, se recomienda mantener la planta madre, la planta donante de brotes, en un invernadero en condiciones controladas desde varias semanas hasta varios meses. En este entorno, las plantas se cultivan en condiciones higiénicas óptimas con un control adecuado de los nutrientes y el riego para garantizar un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Castillo, 2020, p. 2).

2.3.2. Desinfección

Una vez seleccionada la planta madre, se obtienen fragmentos de los que se obtienen explantes. Los explantes pueden ser brotes, hojas, raíces, semillas y similares. Antes de extraer los explantes, se esterilizarán fragmentos de la planta madre para eliminar los contaminantes externos. Los contaminantes más comunes son hongos y bacterias que viven naturalmente en el medio ambiente. Una vez que el material vegetal ha sido esterilizado, debe almacenarse en condiciones estériles (Castillo, 2020, p. 3).

*2.3.3. Establecimiento *in vitro**

Después de la esterilización superficial, las semillas o brotes se colocan en un medio estéril, según el material elegido. En una semana o quince días comienza el proceso de brotación o regeneración de nuevo tejido vegetal y comienza el ciclo de cultivo *in vitro* (Castillo, 2020, p. 3).

2.4. Metodología de establecimiento *in vitro* de la mora de castilla

El proceso de desinfección estuvo realizado por un pretratamiento, incluida la limpieza de los explantes con jabones comerciales y cepillos. De cada estaca se tomaron segmentos nodales de 1 cm de largo, aquellos que contenían yemas axilares se colocaron en un frasco de vidrio con solución antioxidante por 5 minutos. A continuación, los explantes se sometieron a dos métodos de desinfección de la superficie. Después del contacto con desinfectantes, hipoclorito de sodio que contenga Tween 20, alcohol y otros desinfectantes, llevaron dos veces con agua destilada estéril (Guamán, 2018, p. 20-21).

2.4.1. Multiplicación

En esta etapa, se espera que los explantes que sobrevivan a las fases 1 y 2 produzcan brotes axilares o adventicios con múltiples hojas. En la base de cada hoja hay un capullo que se desarrolla en contacto con el medio de cultivo. Estos brotes deben transferirse regularmente a un nuevo medio por división y volver a sembrarse en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en cámaras de flujo laminar o áreas aisladas que permiten mantener condiciones de esterilidad. De esta forma, el número de plantas por hueco de planta o división de planta (Castillo, 2020, p. 3).

Existen diferentes vías de propagación que permiten realizar la multiplicación, incluida la propagación de yemas por yemas terminales, yemas axilares o yemas laterales, generalmente con un meristema como material de partida. El microinjerto, que tiene como objetivo clonar plantas libres de patógenos, embriones y cultivos de esporas, generalmente tiene como objetivo crear bancos de genes y cultivar semillas que serían difíciles de cultivar en condiciones naturales (Pedroza-Manrique, 2008; Krikorian, 1991, citados en Ribón et al., 2020, p. 25).

2.5. Metodología de la multiplicación *in vitro* de la mora de castilla

Cuando los explantes están sanos y libres de contaminantes, se dividen y se transfieren a medio de multiplicación MS suplementado con concentraciones de (GA3), (BAP) y sacarosa al 30%. Después de 4 semanas de crecimiento, los explantes nuevos fueron divididos y transferidos a medio de multiplicación fresco hasta alcanzar el número de explantes para cada genotipo evaluado (Cancino, 2015, p. 7-15).

2.5.1. *Protocolos*

Explantos: Nudos colectados de árboles de 12 años de edad

Temperatura: 25 ± 2 °C

Procedimiento: Desinfectar con Cetavlon (antiséptico) al 1% (v/v) + Cetrimida (antiséptico) al 20% p/v por 15 min. Después enjuagar con agua destilada, luego tratar con etanol al 70% por 30s y HgCl₂ al 0,05% por 2 min y finalmente enjuagar con agua destilada estéril. Una vez desinfectados los explantes pasar al medio I, II, para luego subcultivar cada 4 semanas hasta obtener un mayor índice de multiplicación de 50-80 brotes, finalmente pasar a un medio III de enraizamiento. Trasplantar las plántulas a un sustrato y mantenerlas cubiertas durante 3- 5 días (Cárdenas, et al, 2014, p. 76).

2.6. Cultivo de Mora de castilla

2.6.1. *Generalidades*

La mora castellana (*Rubus glaucus* Benth) es una fruta muy apreciada en el mercado nacional e internacional. Actualmente se conocen variedades de mora en el altiplano tropical de América, principalmente en los Andes de Ecuador y Colombia. Es una planta silvestre. Esta fruta es muy demandada porque es un excelente recurso alimenticio, rico en minerales y vitaminas (Cico,2009, citado en Paramo, 2018, p. 5).

Fue descubierta por Hartw y descrita por Benth, se llama *Rubus* que en latín es rojo y glaucus que en latín significa blanquecino, por el color del envés de la hoja. En la época de la colonia, las familias nobles creían que la mora que comían provenía de Castilla España de ahí el nombre castellano de moras de castilla (Garzón & Gómez, 2015, citado en Vega, 2018, p. 2).

En el reino vegetal, el género *Rubus* tiene una gran cantidad de especies, en casi todo el mundo, excepto en lugares morfológicamente subdesarrollados y áreas desérticas, Estados Unidos comenzó en 1840 con diversos trabajos para lograr mejores y mejoradas variedades morfológicas y fisiológicas características, después de este trabajo se iniciaron unas 500 especies de moras templadas con varias y nuevas modificaciones (Rodríguez Vázquez., 2014, citado en Calapiña, 2020, p.7).

2.6.2. Taxonomía

Clasificación de la mora de castilla según Martínez, y otros (2007) citado en Paramo (2018, p.6).

Tabla 3-2: Composición general para medios de cultivo *in vitro*.

Reino:	Vegetal
Clase:	Angiosperma
Orden:	Rosales
Familia:	Rosaceae
Género:	<i>Rubus</i>
Especie:	<i>glaucus</i>
Nombre científico:	<i>Rubus glaucus</i> Benth
Nombre vulgar:	Mora de castilla

Fuente: Paramo, 2018, p. 6

Realizado por: Bonilla, A, 2023

2.6.3. Descripción Botánica

Según INIAP (2016), citado en Vega (2018, p.3-4) menciona la descripción botánica de la mora de castilla.

Raíces: El sistema radicular es profundo, distribuido en los primeros 30 cm de suelo, colocados horizontalmente, de 0,5 a 1,2 m de largo. Sostienen la planta y le permiten propagar lo que se puede considerar raíces típicas, las raíces secundarias no son profundas y tienen una profundidad de 10 cm a 20 cm en suelos francos (INIAP, 2016, citado en Vega, 2018, p.3-4).

Tallos: Son espinosos con un diámetro entre 1 a 2 centímetros y de 3 a 4 metros de longitud por lo que se clasifican en tallos primarios, secundarios, y terciarios (INIAP, 2016, citado en Vega, 2018, p.3-4).

Las flores: Las flores por lo general se desarrollan tanto en racimos terminales como laterales, contiene cinco pétalos de color blanco a violeta o rosado, por ende, va dependiendo del tipo de mora, además son hermafroditas y actinomorfas de varios estambres y pistilo (INIAP, 2016, citado en Vega, 2018, p.3-4).

Los frutos: Es un tipo de agregado llamado drupa que contiene sus semillas y está conectado por un eje común. Hay hasta 90 tipos de frutas en la inflorescencia de la mora, y el sabor, la acidez y

el contenido de azúcar también varían según la variedad de mora cultivada. Los frutos son redondos u ovalados, rojos, y cada fruto tiene una gran cantidad de diminutas semillas, y una planta bien desarrollada puede producir 3.600 frutos (INIAP, 2016, citado en Vega, 2018, p.3-4).

Las hojas: Tienen tres folíolos, ovoides de 3 a 5 centímetros de largo con espinas ganchudas (INIAP, 2016, citado en Vega 2018, p.3-4).

2.6.4. Importancia de la variedad

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), originaria de la región andina, a su vez es un frutal que ha sido cultivado tradicionalmente por los ecuatorianos, en especial por pequeños y medianos productores de la sierra y que ha favorecido de manera importante en la generación de recursos económicos y mejoramiento del nivel de vida de estos, por la creciente demanda y rentabilidad del cultivo (INIAP,2016, p.16). La variedad conocida como mora negra (*Rubus glaucus*, Benth), es la de mayor importancia comercial y la más cultivada en el país, en regiones comprendidas entre 2500 a 3000 m.s.n.m. del Ecuador (INIAP, 2016, citado en Vega, 2018, p. 5).

Métodos de propagación de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth)

- **Sexual:** por semillas no es recomendada con fines comerciales debido a su lenta germinación (INIAP, 2016, citado en Vega, 2018, p. 5).
- **Asexual o agámica:** es la reproducción de las plantas por medio de órganos vegetativos que puede ser raíces, brotes u hojas, lo que es posible porque algunas especies son capaces de producir una nueva planta a partir de estos órganos cuando se separan de la planta madre original (INIAP, 2016, citado en Vega, 2018, p. 5).
- **Acodos:** este método hace que las raíces adventicias se extiendan a la rama mientras aún está adherida a la planta madre. Mientras que el tallo una vez enraizado, es separado para convertirse en una planta nueva la cual crece con sus propias raíces (INIAP, 2016, citado en Vega, 2018, p. 5).
- **Estacas:** se usa partes del tallo, raíz o partes de hojas que se separan de la planta madre y se forman en condiciones ambientales favorables para formar raíces y brotes, lo que da como resultado una planta idéntica a la planta de la cual se origina (INIAP, 2016, citado en Vega, 2018, p. 10).

CAPITULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Características del lugar

3.1.1. Localización

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, del CIITAT (El Centro de Investigación e Innovación Tecnológica Agropecuaria de Tungurahua), el centro está ubicado en el barrio ciudad Nueva, del cantón Píllaro de la provincia de Tungurahua.

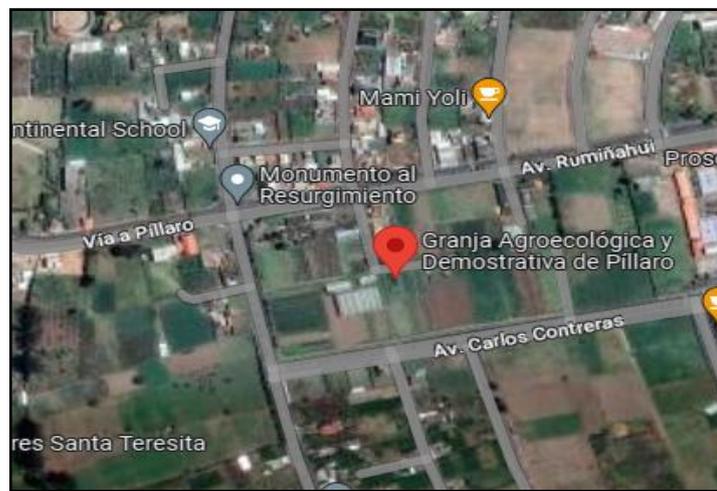


Ilustración 1-3: Ubicación del laboratorio de Biotecnología Vegetal CIITAT y las plantas madre de la mora de castilla.

Fuente: Google maps

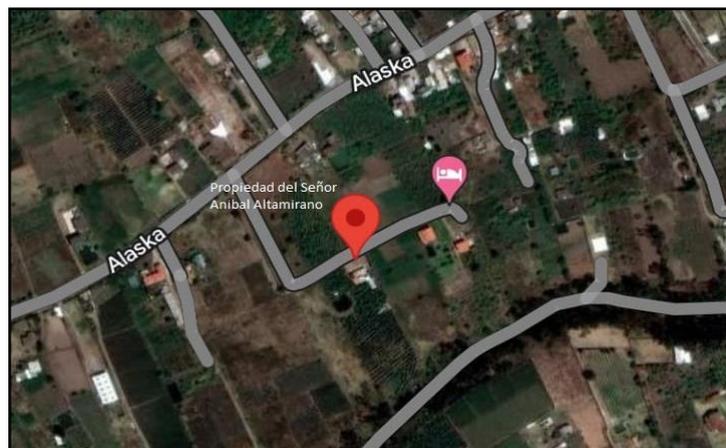


Ilustración 2-3: Ubicación de las plantas madre de la mora de castilla en la propiedad del Señor Aníbal Altamirano

Fuente: Google maps

3.1.2. Ubicación geográfica

Laboratorio de Biotecnología Vegetal

- Longitud: 78°33'33, 54"
- Latitud: 1°10'36,936"
- Altitud: 2787,7 m. s. n. m.

Fuente: UTM Geo Map

Propiedad del señor Aníbal Altamirano

- Longitud: 78°38'59,51"
- Latitud: 1°19'5,82"
- Altitud: 3036,7 m. s. n. m

Fuente: Google Maps

3.1.3. Condiciones del laboratorio

- Temperatura: 19° C
- Humedad promedio: 30-50%

3.2. Materiales y equipos

3.2.1. De escritorio

- Computadora
- Impresora
- Regla
- Lápices
- Borrador
- Carpeta
- Libreta de apuntes
- Esferos
- Papelería en general
- Marcadores
- Tijeras

3.2.2. De laboratorio

3.2.2.1. Materiales

- Pinzas
- Etiquetas
- Fosforera
- Cámara fotográfica
- Mascarillas
- Vaso de precipitación (1000 mL y 50 mL)
- Pipeta de plástico (3 mL)
- Probeta de vidrio (10 mL)
- Frascos de tapa azul boeco (500 mL y 100 mL)
- Cepillo de dientes
- Mechero de alcohol
- Stretch film
- Cinta scotch
- Papel toalla
- Zapatones
- Guantes
- Cofia
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Jeringa (60 mL)
- Estantes metálicos con vidrio
- Luz automatizada
- Calefactor
- Cucharillas metálicas
- Papel aluminio
- Camiseta blanca

3.2.2.2. Materiales de desinfección

- Detergente
- Jabón líquido neutro (Neutro biberones)

- Lavavajillas
- Fungicidas (Carbendazim Carbenex y Sulfato de Cobre pentahidratado Phyton)
- Alcohol 70 %
- Hipoclorito de Sodio (NaClO) al 1%.

3.2.2.3. *Reactivos*

- Reguladores de crecimiento:
 - 6-Bencilaminopurina (BAP) (Phytotech labs)
 - Ácido Indol Butírico (IBA) (Phytotech labs)
 - Ácido Giberélico (GA3) (Phytotech labs)
- Vitamina:
 - Pantetonato (Phytotech labs)
- Sacarosa (azúcar comercial)
- Solución Stock 4,43 g/L Murashige and Skoog basal Salt Mixture (M&S) (Phytotech)
- Agar power (SRL-Srlchem)
- Ácido cítrico para regular pH.
- Hidróxido de sodio (NaOH) para regular pH.
- Carbón Activado
- Agua destilada.

3.2.2.4. *Equipos*

- Cabina de flujo laminar (Re-belk)
- Autoclave BOE-NINKS1-280B
- Balanza analítica Boeco Germany (BAS 31 plus)
- Refrigeradora Walker tecnologin americana (wifi) (USC-230)
- Termohigrómetro (RC-51H)
- Medidor de pH digital peachimetro Milwaukee (MW809)
- Calentador (Hot plate) (MS-300HS)

3.2.2.5. *Instrumentos y procesos*

- Pinzas pequeñas y grandes: N° 3 y 4 y de 20cm
- Hojas y mangos de Bisturíes: N°11 y N°20
- Tijera de podar (PRETUL)

3.3. Metodología

3.3.1. Selección del material vegetal

El material vegetal que se seleccionó fue de plantas madre en campo, las mismas que cumplían con los parámetros fitosanitarios adecuados como sanidad y otros parámetros de calidad como el vigor y productividad.

Se recolectó el material vegetal del huerto de mora, variedad Castilla con espinas de la Estación Experimental del INIAP ubicado en el cantón Píllaro (Longitud: 78°33'33, 54", Latitud: 1°10'36,936", Altitud: 2787,7 m. s. n. m) y de un huerto de mora, variedad castilla con espinas de propiedad del Señor Aníbal Altamirano ubicado en la parroquia Huachi Grande, cantón Ambato, provincia de Tungurahua (Longitud: 78°38'59,51", Latitud: 1°19'5,82", Altitud: 3036,7 m. s. n. m).

3.3.2. Protocolos

En el presente estudio se analizaron tres protocolos los cuales consistieron en:

3.3.2.1. Protocolo 1

Desinfección en Campo y recolección de estacas

Se hicieron dos aplicaciones fitosanitarias de forma foliar a los 8 y 15 días, antes de la recolección del material vegetal, reduciendo así la carga de patógenos que puedan tener las plantas.



Ilustración 3-3: Desinfección de las plantas madre en campo (A) Aplicación fitosanitaria en las plantas de mora de castilla ubicadas en la granja Píllaro-INIAP (B) Aplicación fitosanitaria en las plantas de mora de castilla ubicadas en la propiedad del señor Aníbal Altamirano.

Realizado por: Bonilla, Abigail, 2023

Se desinfectó con alcohol al 70% la tijera de podar, se cortaron explantes de 40 cm de longitud de manera aséptica, colocando los explantes en sobres o bolsas de plástico para su envío al laboratorio de biotecnología vegetal, del CIITAT.



Ilustración 4-3: Desinfección de las plantas madre en campo y recolección de estacas (A) Desinfección de la tijera con alcohol al 70% (B) se cortaron explantes de 40 cm de longitud (C) se colocó los explantes dentro de bolsas de plástico.

Realizado por: Bonilla, Abigail, 2023

Desinfección en el Laboratorio

Se deshojaron y se procedieron a lavar los explantes con la ayuda de un cepillo dental en una bandeja con agua de caño (grifo) y jabón líquido neutro, posteriormente se enjuagaron hasta no dejar restos de detergente y eliminar la mayor parte de impurezas.



Ilustración 5-3: Desinfección de las plantas madre en campo y recolección de estacas (A) Se deshojó de los explantes (B) se lavó el explante con la ayuda de un cepillo dental y jabón neutro (C) se cortó los explantes para colocarlos dentro de los frascos.

Realizado por: Bonilla, Abigail, 2023

Se sumergieron los explantes en los fungicidas Carbendazim (1,5 mL/L) y Sulfato de Cobre pentahidratado (1,5 mL/L) por 60 min en agitación continua, finalizado este paso se realizó tres lavados con agua estéril.



Ilustración 6-3: Desinfección de las plantas madre en campo y recolección de estacas (A) Explantes sumergidos en los fungicidas (B) Explantes enjuagados.

Realizado por: Bonilla, Abigail, 2023

Desinfección en el Laboratorio dentro de cámara de flujo

Se sumergieron los segmentos nodales en alcohol al 70% durante 1 min, terminado este paso se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril, luego se sumergieron los segmentos nodales en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 10 min y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril como se detalla en la tabla 3-3.

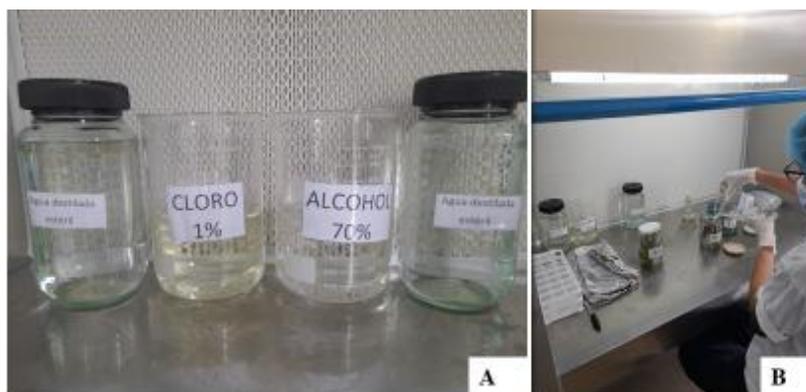


Ilustración 7-3: Desinfección en el laboratorio dentro de la cámara de flujo (A) Materiales de desinfección (cloro 1%), (alcohol 70%), (agua destilada) (B) Segmentos nodales sumergidos en alcohol al 70% en diferentes tiempos y en cloro al 1% en diferentes tiempos.

Realizado por: Bonilla, Abigail, 2023

Preparación de medio de cultivo para establecimiento y multiplicación

Los segmentos nodales fueron sembrados en tubos de ensayo de 25 x 150 mm con 10 mL de un medio MS (Murashige & Skoog) de micropropagación basado en macro y micro elementos con tres protocolos diferentes (ver tabla 3-3) además se suplemento con 2 g/L de carbón activado, el cual reduce la oxidación del tejido, sacarosa (30 g/L) como fuente de carbono, agar power (10 g/L) como agente gelificante, posteriormente se añadió 1 ppm de Ácido giberélico, 1 ppm de 6-Bencilaminopurina, 0,3 ppm Acido Indol Butírico, 0,6 ppm de pantetonato . El medio fue ajustado a un pH de 5,5 con Ácido cítrico a 1N o NaOH a 1N.

3.3.2.2. Protocolo 2

Desinfección en Campo

Se hicieron aplicaciones fitosanitarias de forma foliar a los 8 y 15 días antes de la recolección del material vegetal, reduciendo así la carga de patógenos que puedan tener las plantas.

Se desinfectó con alcohol al 70% la tijera de podar, se cortaron los explantes de 40 cm de longitud de manera aséptica colocándolos en sobres o bolsas de plástico para su envío al laboratorio de biotecnología vegetal, del CIITAT.

Desinfección en el Laboratorio

Se deshojaron y lavaron los explantes en una bandeja con agua de caño (grifo) y jabón líquido neutro, se enjuagaron hasta no dejar restos de detergente y eliminar la mayor parte de impurezas. Se sumergieron los explantes en fungicida carbendazim (1,5 mL/L) y en Sulfato de Cobre pentahidratado (1,5 mL/L) por 60 min en agitación continua, finalizado este paso se realizó un lavado con agua estéril.

Desinfección en el Laboratorio dentro de cámara de flujo

Se sumergieron los segmentos nodales en alcohol al 70% durante 30 s, terminado este paso se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril, luego se sumergieron los segmentos nodales en una solución de hipoclorito de sodio al 1%, durante 5 min y se lavaron tres veces con agua destilada estéril como se detalla en la tabla 3-3.

Preparación de medio de cultivo para establecimiento y multiplicación

Los segmentos nodales fueron sembrados en tubos de vidrio de 25x 150 mm con 10 mL de un medio MS (Murashige & Skoog) de micropropagación basado en macro y micro elementos con tres protocolos diferentes (ver tabla 3-3) además se suplemento con 2g/L de carbón activado, el cual reduce la oxidación del tejido, sacarosa (30 g/L) como fuente de carbono, agar power (10 g/L) como agente gelificante, posteriormente se añadió 0,5 ppm de Ácido giberélico, 0,5 ppm de 6-Bencilaminopurina, 0,1 ppm Acido Indol Butírico, 1 ppm de pantetonato . El medio fue ajustado a un pH de 5,5 con Ácido cítrico a 1N o NaOH a 1N.

3.3.2.3. Protocolo 3

Desinfección en Campo

Se hicieron aplicaciones fitosanitarias de forma foliar a los 8 y 15 días antes de la recolección del material vegetal, reduciendo así la carga de patógenos que puedan tener las plantas.

Se desinfectó con alcohol al 70% la tijera de podar, luego se cortaron los explantes de 40 cm de longitud de manera aséptica, colocándolos en sobres o bolsas de plástico para su envío a laboratorio de biotecnología vegetal, del CIITAT.

Desinfección en el Laboratorio

Se deshojaron y lavaron los explantes en una bandeja con agua de caño (grifo) y jabón líquido neutro, se enjuagaron hasta no dejar restos de detergente y eliminar la mayor parte de impurezas. Se sumergieron los explantes en fungicida carbendazim (1,5mL/L) y Sulfato de Cobre pentahidratado (1,5mL/L) por 60 min en agitación continua. Finalmente, se realizó un lavado con agua estéril.

Desinfección en el Laboratorio dentro de cámara de flujo

Se sumergieron los segmentos nodales en alcohol al 70%, durante 3 min, terminado este paso se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril, luego se sumergieron los segmentos nodales en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 15 min y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril como se detalla en la tabla 3-3.

Preparación de medio de cultivo para establecimiento y multiplicación

Los segmentos nodales fueron sembrados en tubos de vidrio de 25x 150 mm con 10 mL de un medio MS (Murashige & Skoog) de micropropagación basado en macro y micro elementos con tres protocolos diferentes (ver tabla 3-3) además se suplemento con 2g/L de carbón activado, el cual reduce la oxidación del tejido, sacarosa (30 g/L) como fuente de carbono, agar power (10 g/L) como agente gelificante, posteriormente se añadió 1,5 ppm de Ácido giberélico, 1,5 ppm de 6-Bencilaminopurina, 0,5 ppm Acido Indol Butírico, 0,2 ppm de pantetonato. El medio fue ajustado a un pH de 5,5 con Ácido cítrico a 1N o NaOH a 1N.

Tabla 3-3: Desinfección en campo, desinfección en el laboratorio dentro de la cámara de flujo y preparación de medio de cultivo para establecimiento y multiplicación.

Tratamientos		Protocolo	Protocolo	Protocolo	
		1	2	3	
Desinfección en campo	Carbendanzim	1cc/L	1cc/L	1cc/L	
	Phyton	1cc/L	1cc/L	1cc/L	
Desinfección en el laboratorio dentro de la cámara de flujo					
Desinfección los segmentos nodales	Alcohol 70%	1 min	30 s	3 min	
	Cloro 1%	10 min	5 min	15 min	
Establecimiento in vitro					
Preparación de medio de cultivo	Medio de cultivo (estándar) pH 5,5	Murashige and Skoog	4,43g/L	4,43g/L	4,43g/L
		Sacarosa	30g/L	30g/L	30g/L
		Agar power	10g/L	10g/L	10g/L
	Hormonas y Vitaminas	Pantetonato	0,6 ppm	0,6 ppm	0,6 ppm
		IBA	0,3 ppm	0,3 ppm	0,3 ppm
		BAP	1 ppm	1 ppm	1 ppm
		GA ₃	1 ppm	1 ppm	1 ppm
	Multiplicación				
	Medio de cultivo (estándar) pH 5,5	Murashige and Skoog	4,43g/L	4,43g/L	4,43g/L
		Sacarosa	30g/L	30g/L	30g/L
Agar power		10g/L	10g/L	10g/L	
Hormonas y Vitaminas	Pantetonato	0,6 ppm	1 ppm	0,2 ppm	
	IBA	0,3 ppm	0,1 ppm	0,5 ppm	
	BAP	1 ppm	0,5 ppm	1,5 ppm	
	GA ₃	1 ppm	0,5 ppm	1,5 ppm	

Realizado por: Bonilla, A., 2023

3.3.3. Establecimiento del material vegetal in vitro

En los frascos de vidrios, estando los segmentos nodales ya desinfectados y sellados, se pasó al cuarto de micropropagación o área de transferencia, para su establecimiento. Se sembraron los segmentos nodales en los tubos de ensayo con gel nutritivo medio de cultivo. Se realizaron cortes con pinza y bisturíes, todo de forma estéril, siendo estos sellados con stretch film, y llevados al área de incubación.

Incubación *In vitro*: se incubaron los tubos de ensayo con segmentos nodales de mora a una temperatura de 22 °C, iluminación de 3000 lux, un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad y humedad relativa del 85%.

Duración del establecimiento 20 a 30 días para la generación de brote de la yema y posterior extracción de explantes. Posterior a ese tiempo, se pasó a otro medio de cultivo.

3.3.4. Establecimiento de explantes o cultivo de primeras yemas

3.3.4.1. Clonación

Después de 45 días aproximadamente los explantes fueron trasferidos al medio de multiplicación, iniciándose su clonación exponencial. Esta fase se refiere a la propagación masiva de las vitroplantas de mora, pudiendo lograr varios subcultivos o resiembras cada mes.

Duración de la fase: 25 a 35 días.

Incubación *In vitro*: Se incubaron los tubos de ensayo con yemas de mora a una temperatura de 22 °C, iluminación de 3000 lux, un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad y humedad relativa del 85%.

3.4. Variables y métodos de evaluación *in vitro*

3.4.1. Porcentaje de contaminación

Se determinó el porcentaje de contaminación de hongos y bacterias con observaciones cada 8 días, a partir de establecimiento hasta la multiplicación. Se usó la fórmula propuesta por Guamán (2018), p. 24, que menciona que el porcentaje de contaminación se evalúa mediante la siguiente fórmula.

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

3.4.2. Niveles de oxidación

Se contabilizaron los segmentos nodales oxidados a partir del día del establecimiento hasta la multiplicación. Para la evaluación se utilizó una escala de oxidación propuesta por (Guamán, 2018, p.24)

Tabla 4-3: Niveles de oxidación

Nivel	Categoría	Descripción
1	No oxidado	El segmento nodal es viable y no presenta oxidación
2	Oxido vivo	Presencia de necrosamiento, pero no en un nivel avanzado, si no que tenga viabilidad el segmento nodal.
3	Oxido muerto	Necrosamiento total

Fuente: Guamán, (2018), p.24.

Realizado por: Bonilla, A, 2023

3.4.3. Tiempo de brotación

El tiempo de brotación se evaluó mediante observaciones, se contabilizaron los brotes emergidos todos los días de las unidades experimentales desde el día de la siembra de los segmentos nodales hasta 45 días después.

3.4.4. Número de brotes

Se observó el apareamiento de brotes de cada segmento nodal, dando valores de 1 al segmento nodal que presentaban brotes y 0 al que no presentaba brotes. Se evaluó esta variable desde el día del establecimiento hasta la multiplicación.

3.4.5. Altura de los brotes

Se determinó la altura de los brotes desde el día que aparecieron los brotes del segmento nodal hasta la multiplicación.

3.4.6. Número de brotes para multiplicar

Se contabilizaron el número de brotes de cada segmento nodal para su multiplicación después de los 45 días que fueron establecidos.

3.4.7. Altura de las primeras yemas multiplicadas

Se determinaron las alturas con la ayuda de una regla milimétrica desde que aparecieron los brotes de las yemas multiplicadas.

3.5. Registro de datos

Para las variables porcentaje de contaminación y oxidación fueron tomados cada 8 días. Por otro lado, el tiempo de brotación fue evaluado todos los días, mientras que el número de los brotes y altura de brotes fueron tomados cada 15 días desde la introducción.

3.6. Análisis de datos

Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) con 3 tratamientos y tres repeticiones, el bloque constituyo el tiempo en que se implementaron las repeticiones.

Se determino el coeficiente de variación y se representó expresando en porcentaje. Cuando exista diferencia significativa entre tratamientos para separar medias se utilizó Tukey al 5 %.

CAPITULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Porcentaje de contaminación

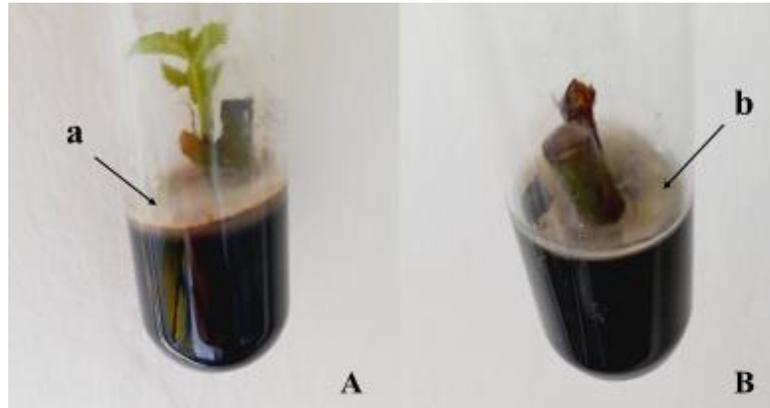


Ilustración 8-4: Contaminación asociada a segmentos nodales de *Rubus glaucos* Benth, luego del proceso de desinfección durante el establecimiento en laboratorio. (A) Hongo, (a) micelio de color blanco (B) Bacteria, (b) capa brillante de color café claro.

Realizado por: Bonilla, A., 2023

Como se observa en la ilustración 8-4(A) hongo (a) la característica que se observó de la contaminación por hongos fue el crecimiento del micelio de color blanco alrededor del tejido y en el medio de cultivo y en la ilustración 8-4 (B) Bacteria, (b) la característica de la contaminación bacteriana es una capa brillante de color café claro.

En la mayoría de los tratamientos y de repeticiones que se realizaron, aproximadamente el 90% de la contaminación estaba atribuida por hongos, mientras que solo un 10% de bacterias, por eso los resultados que se presentan a contaminación son basados en la contaminación por hongo.

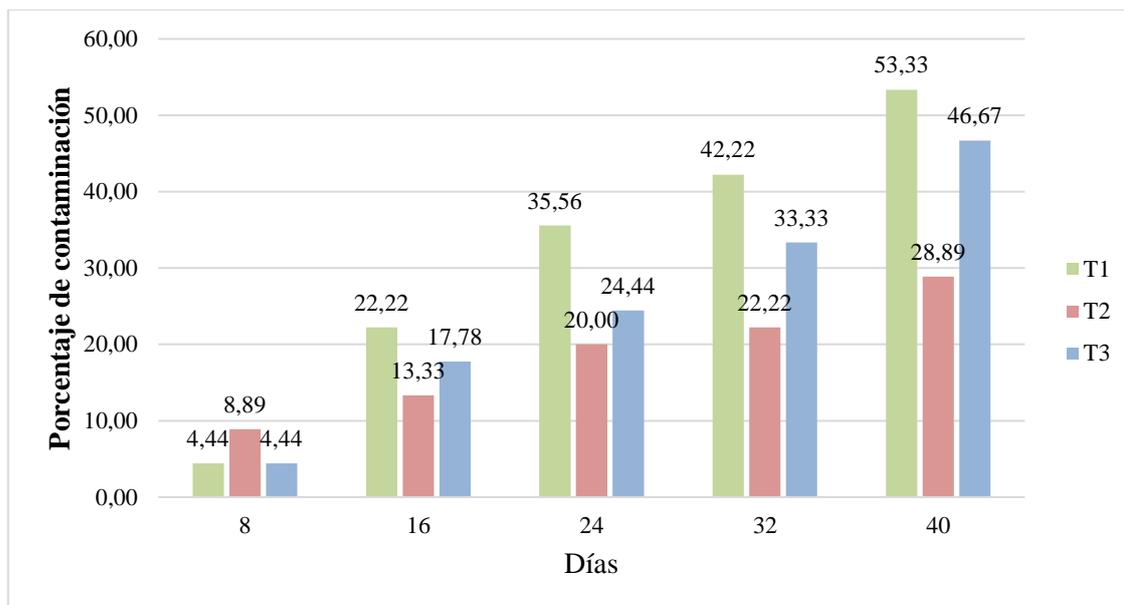


Ilustración 9-4: Porcentaje de contaminación a los 8, 16, 24, 32 y 40 días de cada tratamiento.

Realizado por: Bonilla, A., 2023

Como se puede observar a los 8 días el tratamiento 1 (protocolo 1) presentó el mayor porcentaje de contaminación fúngica en promedio con un 4,44% y el que menor porcentaje de contaminación en promedio por hongos fue el tratamiento 2 (protocolo 2) con un 8,89%. A los 16 días el tratamiento 1 (protocolo 1) tuvo el mayor porcentaje de contaminación en promedio con un 22,22%, mientras que el tratamiento 2 (protocolo 2) presentó el menor porcentaje de contaminación en promedio con un 13,33%. A los 24 días el tratamiento 1 (protocolo 1) presentó el mayor porcentaje de contaminación con un 35,46% y el que menor porcentaje de contaminación fue el tratamiento 2 (protocolo 2) con un 20,00%. A los 32 días el tratamiento 1 (protocolo 1) presentó el mayor porcentaje de contaminación en promedio (42,22%) y el menor porcentaje de contaminación (22,22%) lo presentó el tratamiento 2 (protocolo 2). A los 40 días el tratamiento 1 (protocolo 1) obtuvo el mayor porcentaje de contaminación con un 53,33%, y el tratamiento 2 (protocolo 2) fue el que obtuvo el menor porcentaje de contaminación en promedio con un 28,89% (Ilustración 9-4).

Tabla 5-4: Análisis de varianza de la contaminación asociada a segmentos nodales de *Rubus glaucus* Benth, luego del establecimiento *in vitro* en el laboratorio a los 8 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr(>F)
Tratamientos	2	39,51	19,75	1,6	0,309
Bloque	2	39,51	19,75	1,6	0,309
Error	4	49,38	12,35		

Realizado por: Bonilla, A., 2023

El análisis de varianza (ANOVA) indicó que a los 8 días no existieron diferencias significativas en los tratamientos ($P>0,05$), demostrando que no hubo efecto de los diferentes protocolos sobre la contaminación para el establecimiento *in vitro* a partir de los segmentos nodales de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) (tabla 5-4).

Tabla 6-4: Análisis de varianza de la contaminación asociada a segmentos nodales de *Rubus glaucus* Benth, luego del establecimiento *in vitro* en el laboratorio a los 16 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr(>F)
Tratamientos	2	118,5	59,26	0,8	0,510
Bloque	2	207,4	103,70	1,4	0,346
Error	4	296,3	74,07		

Realizado por: Bonilla, A., 2023

El análisis de varianza (ANOVA) indicó que a los 16 días no existieron diferencias significativas en los tratamientos ($P>0,05$), demostrando que no hubo efecto de los diferentes protocolos sobre la contaminación para el establecimiento *in vitro* a partir de los segmentos nodales de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) (tabla 6-4).

Tabla 7-4: Análisis de varianza de la contaminación asociada a segmentos nodales de *Rubus glaucus* Benth, luego del proceso de desinfección durante el establecimiento en laboratorio a los 24 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr(>F)
Tratamientos	2	385,2	192,59	0,812	0,506
Bloque	2	88,9	44,44	0,187	0,836
Error	4	948,1	237,04		

Realizado por: Bonilla, A., 2023

El análisis de varianza (ANOVA) indicó que a los 24 días no existieron diferencias significativas en los tratamientos ($P>0,05$), demostrando que no hubo efecto de los diferentes protocolos sobre la contaminación para el establecimiento *in vitro* a partir de los segmentos nodales de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) (tabla 7-4).

Tabla 8-4: Análisis de varianza de la contaminación asociada a segmentos nodales de *Rubus glaucus* Benth, luego del establecimiento *in vitro* en el laboratorio a los 32 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr(>F)
Tratamientos	2	602,5	301,23	2,976	0,162
Bloque	2	9,9	4,94	0,049	0,953
Error	4	404,9	101,23		

Realizado por: Bonilla, A., 2023

El análisis de varianza (ANOVA) indicó que a los 32 días no existieron diferencias significativas en los tratamientos ($P > 0,05$), demostrando que no hubo efecto de los diferentes protocolos sobre la contaminación para el establecimiento *in vitro* a partir de los segmentos nodales de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) (tabla 8-4).

Tabla 9-4: Análisis de varianza de la contaminación asociada a segmentos nodales de *Rubus glaucus* Benth, luego del establecimiento *in vitro* en el laboratorio a los 40 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr(>F)
Tratamientos	2	958,0	479,0	2,180	0,229
Bloque	2	128,4	64,2	0,292	0,761
Error	4	879,0	219,8		

Realizado por: Bonilla, A., 2023

El análisis de varianza (ANOVA) indicó que a los 40 días no existieron diferencias significativas en los tratamientos ($P > 0,05$), demostrando que no hubo efecto de los diferentes protocolos sobre la contaminación para el establecimiento *in vitro* a partir de los segmentos nodales de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) (tabla 9-4).

4.2. Oxidación

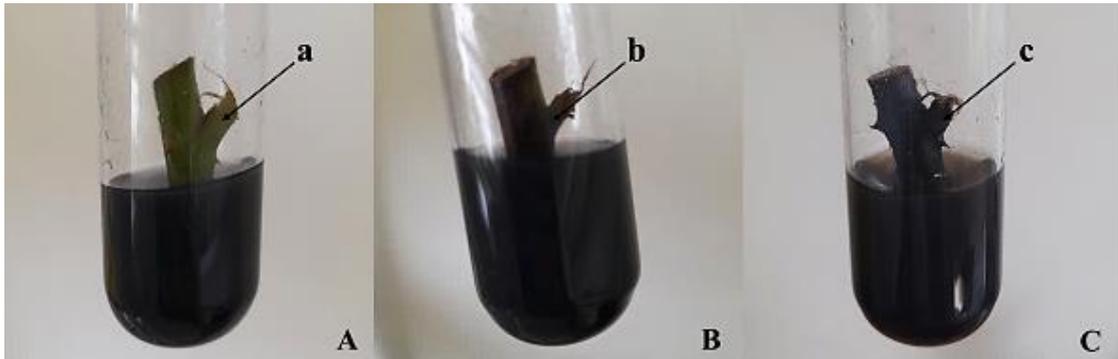


Ilustración 10-4: Diferentes niveles de oxidación de los segmentos nodales (A) nivel 1 (a) no oxidado, (B) nivel 2 (b) oxidado vivo, (C) nivel 3 (c) oxidación muerta

Realizado por: Bonilla, Abigail, 2023

Como se puede observar en la ilustración 3-4(A) nivel 1 (a) no oxidado, (B) como nivel 2 (b) oxidación vivo y (C) nivel 3 (c) oxidación muerta. De manera general aproximadamente el 90% de los todos los tratamientos se observó el nivel 1 de oxidación y un 10 % se observó el nivel 2 y nivel 3 (Ilustración 10-4, tabla 4-3).

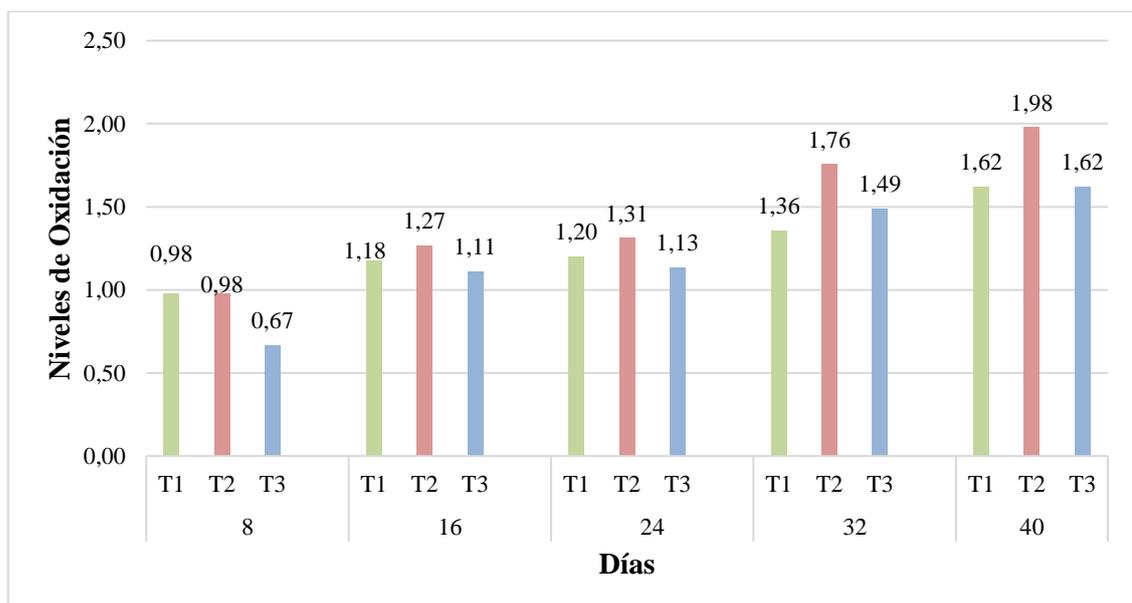


Ilustración 11-4: Niveles de oxidación a los 8, 16, 24, 32 y 40 días de cada tratamiento.

Realizado por: Bonilla, A., 2023

Como se puede observar a los 8 días los tratamientos T1 y T2 (protocolo 1 y 2) presentaron los mayores niveles de oxidación con una media de 0,98 y el tratamiento T3 (protocolo 3) con una media de 0,67. A los 16 días el tratamiento 2 presentó mayores niveles de oxidación con una media de 1,27 y el que menor niveles de oxidación presentó es el tratamiento T3(protocolo 3) con

una media de 1,11. A los 24 días presentó mayores niveles de oxidación el tratamiento T2 (protocolo 2) con una media de 1,31 y el tratamiento T3 (protocolo 3) con una media de 1,13%. A los 32 días presentó mayores niveles de oxidación el tratamiento T2 (protocolo 2) con una media de 1,76 y el tratamiento T3 (protocolo 3) con una media de 1,36. A los 40 días presentó mayores niveles de oxidación el tratamiento 2 con una media de 1,98 y el tratamiento T1 y T2 (protocolo 1 y 2) con una media de 1,62%. Por lo tanto, el que mayores niveles de oxidación presentó fue el tratamiento 2 (protocolo 2) y el que menores niveles de oxidación fue el tratamiento 1 (protocolo 1), con niveles de oxidación de 1 (óxido vivo) y 2 (óxido vivo), en promedio ningún tratamiento llegó a óxido muerto (Ilustración 11-4).

Tabla 10-4: Análisis de varianza de la oxidación asociada a segmentos nodales de *Rubus glaucus* Benth, luego del establecimiento *in vitro* en el laboratorio a los 8 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr(>F)
Tratamientos	2	0,01580	0,007901	1,882	0,265
Bloque	2	0,01580	0,007901	1,882	0,265
Error	4	0,01679	0,0044198		

Realizado por: Bonilla, A., 2023

El análisis de varianza (ANOVA) indicó que a los 8 días no existieron diferencias significativas en los tratamientos ($P > 0,05$), demostrando que no hubo efecto de los diferentes protocolos sobre la oxidación para el establecimiento *in vitro* a partir de los segmentos nodales de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) (tabla 10-4).

Tabla 11-4: Análisis de varianza de la oxidación asociada a segmentos nodales de *Rubus glaucus* Benth, luego del establecimiento *in vitro* en el laboratorio a los 16 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr(>F)
Tratamientos	2	0,03654	0,01827	0,860	0,489
Bloque	2	0,09877	0,04938	2,326	0,214
Error	4	0,08494	0,02123		

Realizado por: Bonilla, A., 2023

El análisis de varianza (ANOVA) indicó que a los 16 días no existieron diferencias significativas en los tratamientos ($P > 0,05$), demostrando que no hubo efecto de los diferentes protocolos sobre la oxidación para el establecimiento *in vitro* a partir de los segmentos nodales de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) (tabla 11-4).

Tabla 12-4: Análisis de varianza de la oxidación asociada a segmentos nodales de *Rubus glaucus* Benth, luego del establecimiento *in vitro* en el laboratorio a los 24 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr(>F)
Tratamientos	2	0,04840	0,02420	1,508	0,325
Bloque	2	0,08988	0,04494	2,800	0,174
Error	4	0,06420	0,01605		

Realizado por: Bonilla, A., 2023

El análisis de varianza (ANOVA) indicó que a los 24 días no existieron diferencias significativas en los tratamientos ($P > 0,05$), demostrando que no hubo efecto de los diferentes protocolos sobre la oxidación para el establecimiento *in vitro* a partir de los segmentos nodales de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) (tabla 12-4).

Tabla 13-4: Análisis de varianza de la oxidación asociada a segmentos nodales de *Rubus glaucus* Benth, luego del establecimiento *in vitro* en el laboratorio a los 32 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr(>F)
Tratamientos	2	0,2489	0,12444	8,4	0,03698*
Bloque	2	0,5807	0,29037	19,6	0,00857**
Error	4	0,0593	0,01481		

Realizado por: Bonilla, A., 2023

El análisis de varianza (ANOVA) indicó que a los 32 días si existieron diferencias significativas en los tratamientos ($P < 0,05$), demostrando que si existió efecto de los diferentes protocolos sobre los niveles de oxidación de los segmentos nodales para el establecimiento *in vitro* de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) (tabla 13-4).

Tabla 14-4: Test de Tukey al 5% de la oxidación asociada a segmentos nodales de *Rubus glaucus* Benth, luego del establecimiento *in vitro* en el laboratorio a los 32 días.

Tratamientos	media	Rango de significancia
2	1,76	a
3	1,49	ab
1	1,36	b

*Letras diferentes denotan diferencias estadísticas significativas según el Test de Tukey al 5%

Realizado por: Bonilla, A., 2023

La prueba Tukey al 5% para la variable oxidación a los 32 días, mostro 3 grupos estadísticos; en el grupo a se encuentra el tratamiento 2; en el grupo ab se encuentra el tratamiento 3; en el grupo b se encuentra el tratamiento 1. El tratamiento 2 presentó mayor porcentaje de oxidación (1,76) y el tratamiento 1 presentó menor porcentaje de oxidación (1,36) (Tabla 14-4).

Tabla 15-4: Análisis de varianza de la oxidación asociada a segmentos nodales de *Rubus glaucus* Benth, luego del establecimiento *in vitro* en el laboratorio a los 40 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr(>F)
Tratamientos	2	0,25284	0,12642	6,4	0,0567
Bloque	2	0,20543	0,10272	5,2	0,0772
Error	4	0,07901	0,01975		

Realizado por: Bonilla, A., 2023

El análisis de varianza (ANOVA) indicó que a los 40 días no existieron diferencias significativas en los tratamientos ($P > 0,05$), demostrando que no hubo efecto de los diferentes protocolos sobre la oxidación para el establecimiento *in vitro* a partir de los segmentos nodales de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) (tabla 15-4).

4.3. Tiempo de brotación



Ilustración 12-4: Segmento nodal brotación tomado mediante de la observación todos los días.

Realizado por: Bonilla, Abigail, 2023

El tiempo de brotación fue evaluado mediante la observación todos los días, cada día se fue observando si los brotes emergieron de cada una de las unidades experimentales, desde el día del establecimiento *in vitro* hasta 45 días después, como se observa en la (Ilustración 12-4) el tipo de emergencia del brote.

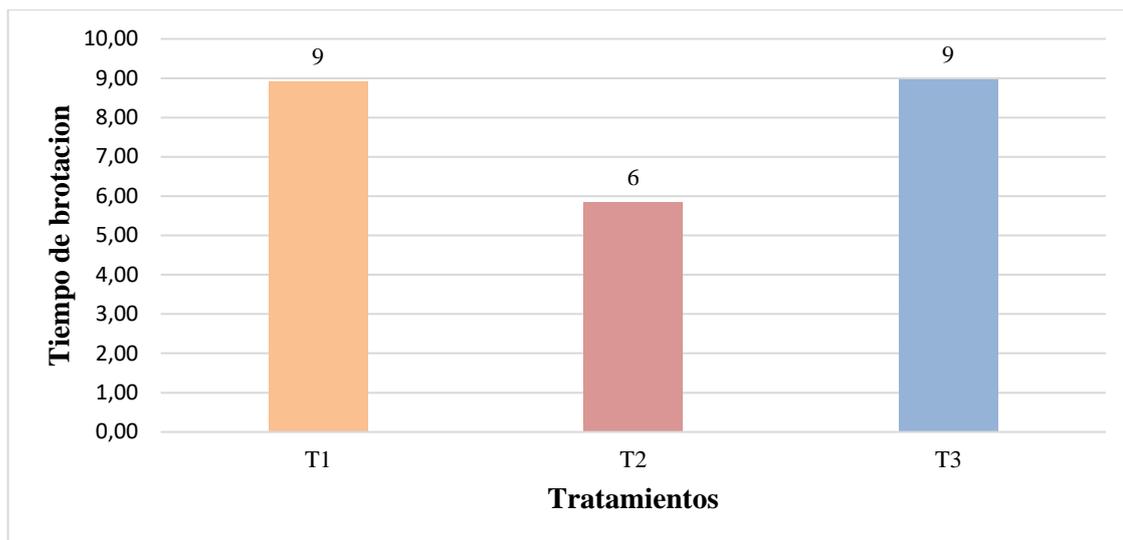


Ilustración 13-4: Tiempo de brotación de los segmentos nodales, observado todos los días de cada tratamiento.

Realizado por: Bonilla, A., 2023

Como se puede observar el tiempo de brotación que más se demoró en emerger fue del tratamiento 3 (protocolo 3) con un promedio de 9 días, el tratamiento 1 (protocolo 1) se demoró en emerger con un promedio intermedio de 9 días y finalmente el que menos se demoró en emerger fue el tratamiento 2 (protocolo 2) con un promedio de 6 días (Ilustración 13-4).

Tabla 16-4: Análisis de varianza del tiempo de brotación asociada a segmentos nodales de *Rubus glaucus* Benth, luego del establecimiento *in vitro* en laboratorio observados todos los días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr(>F)
Tratamientos	2	19,088	9,544	1,856	0,269
Bloque	2	3,374	1,687	0,328	0,738
Error	4	20,566	5,142		

Realizado por: Bonilla, A., 2023

El análisis de varianza (ANOVA) indicó que al observar todos los días no existieron diferencias significativas en los tratamientos ($P > 0,05$), demostrando que no hubo efecto de los diferentes protocolos sobre el tiempo de brotación para el establecimiento *in vitro* a partir de los segmentos nodales de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) (tabla 16-4).

4.4. Número de brotes



Ilustración 14-4: Número de brotes (a) Brotes a los 15 días, (b) Brotes a los 30 días, (c) Brotes a los 45 días.

Realizado por: Bonilla, Abigail, 2023

Como se observa en la ilustración 14-4 (a) los brotes fueron emergidos a los 15 días, en la ilustración 14-4(b) los brotes fueron emergidos a los 30 días y finalmente en la ilustración 14-4 (c) los brotes fueron emergidos a los 45 días.

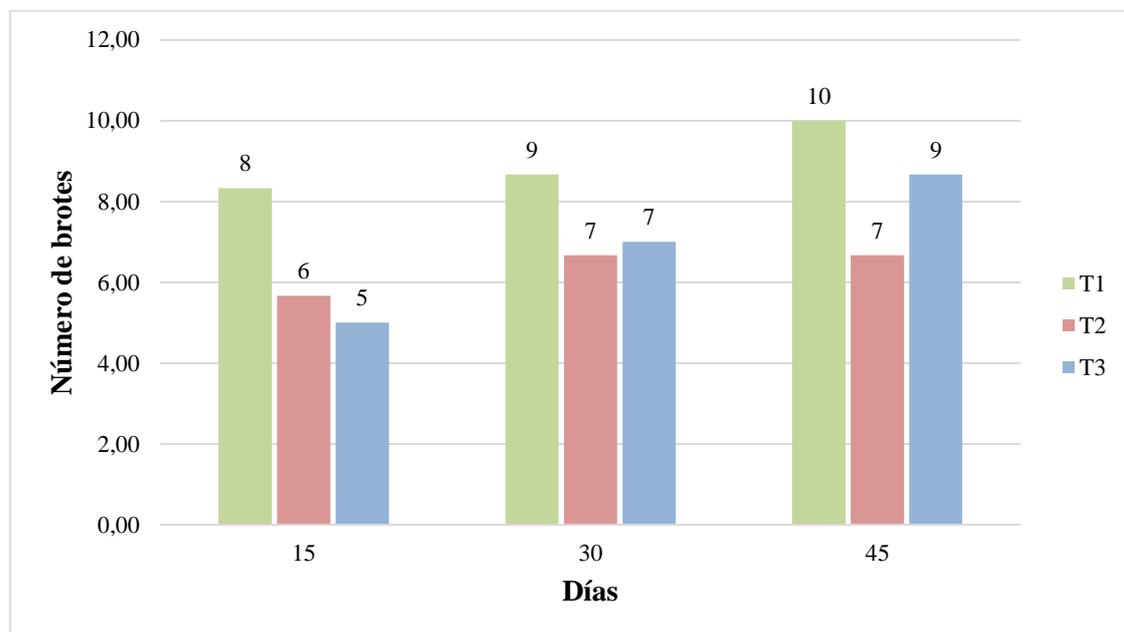


Ilustración 15-4: Número de brotes de los segmentos nodales a los 15, 30 y 45 días de cada tratamiento.

Realizado por: Bonilla, A., 2023

Como se puede observar el número de brotes de los segmentos nodales fueron tomados a los 15, 30 y 45 días, el mayor número de brotes fueron a los 45 días, en la cual el tratamiento 1 (protocolo 1) tuvo mayor número de brotes con un promedio de 10 brotes, el tratamiento 3 (protocolo 3) tuvo

un promedio de 9 brotes y finalmente el tratamiento 2 (protocolo 2) con un promedio de 7 brotes. A los 30 días el tratamiento que mayor número de brotes obtuvo fue el tratamiento 1 (protocolo 1) con un promedio de 9 brotes, el tratamiento 3 (protocolo 3) con un promedio de 7 brotes y el tratamiento 2 (protocolo 2) con un promedio de 7 brotes. A los 15 días, el tratamiento que mayor número de brotes obtuvo fue el tratamiento 1 (protocolo 1) con un promedio de 8 brotes, el tratamiento 2 (protocolo 2) con un promedio de 6 brotes y por último el tratamiento 3 (protocolo 3) con un promedio de 5 brotes (Ilustración 15-4).

Tabla 17-4: Análisis de varianza del número de brotes asociados a segmentos nodales de *Rubus glaucus* Benth, luego del establecimiento *in vitro* en el laboratorio a los 15 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr(>F)
Tratamientos	2	0,08296	0,04148	2,435	0,203
Bloque	2	0,06222	0,03111	1,826	0,273
Error	4	0,06815	0,01704		

Realizado por: Bonilla, A., 2023

El análisis de varianza (ANOVA) indicó que a los 15 días no existieron diferencias significativas en los tratamientos ($P > 0,05$), demostrando que no hubo efecto de los diferentes protocolos sobre los números de brotes para el establecimiento *in vitro* a partir de los segmentos nodales de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) (tabla 17-4).

Tabla 18-4: Análisis de varianza del número de brotes asociados a segmentos nodales de *Rubus glaucus* Benth, luego del establecimiento *in vitro* en el laboratorio a los 30 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr(>F)
Tratamientos	2	0,03062	0,01531	1,000	0,444
Bloque	2	0,04247	0,02124	1,387	0,349
Error	4	0,06123	0,01531		

Realizado por: Bonilla, A., 2023

El análisis de varianza (ANOVA) indicó que a los 30 días no existieron diferencias significativas en los tratamientos ($P > 0,05$), demostrando que no hubo efecto de los diferentes protocolos sobre el número de brotes para el establecimiento *in vitro* a partir de los segmentos nodales de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) (tabla 18-4).

Tabla 19-4: Análisis de varianza del número de brotes asociados a segmentos nodales de *Rubus glaucus* Benth, luego del establecimiento *in vitro* en el laboratorio a los 45 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr(>F)
Tratamientos	2	0,07506	0,03753	4,343	0,0994
Bloque	2	0,09580	0,04790	5,543	0,0703
Error	4	0,03457	0,00864		

Realizado por: Bonilla, A., 2023

El análisis de varianza (ANOVA) indicó que a los 45 días no existieron diferencias significativas en los tratamientos ($P > 0,05$), demostrando que no hubo efecto de los diferentes protocolos sobre los números de brotes para el establecimiento *in vitro* a partir de los segmentos nodales de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) (tabla 19-4).

4.5. Altura de los brotes

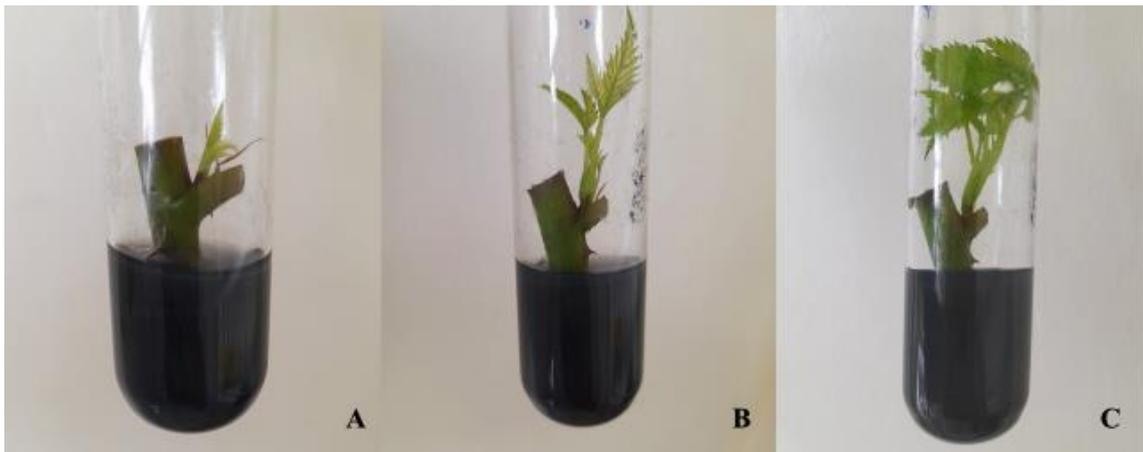


Ilustración 16-4: Alturas de los brotes (a) altura a los 15 días, (b) altura a los 30 días, (c) altura a los 45 días.

Realizado por: Bonilla, Abigail, 2023

Como se puede observar en la ilustración 16-4 (A) el primer brote apareció a los 15 días tomándose la medición de la altura del mismo, en la ilustración 16-4 (B) se observa la altura tomada a los 30 días y finalmente en la ilustración 16-4 (C) se aprecia la altura tomada a los 45 días.

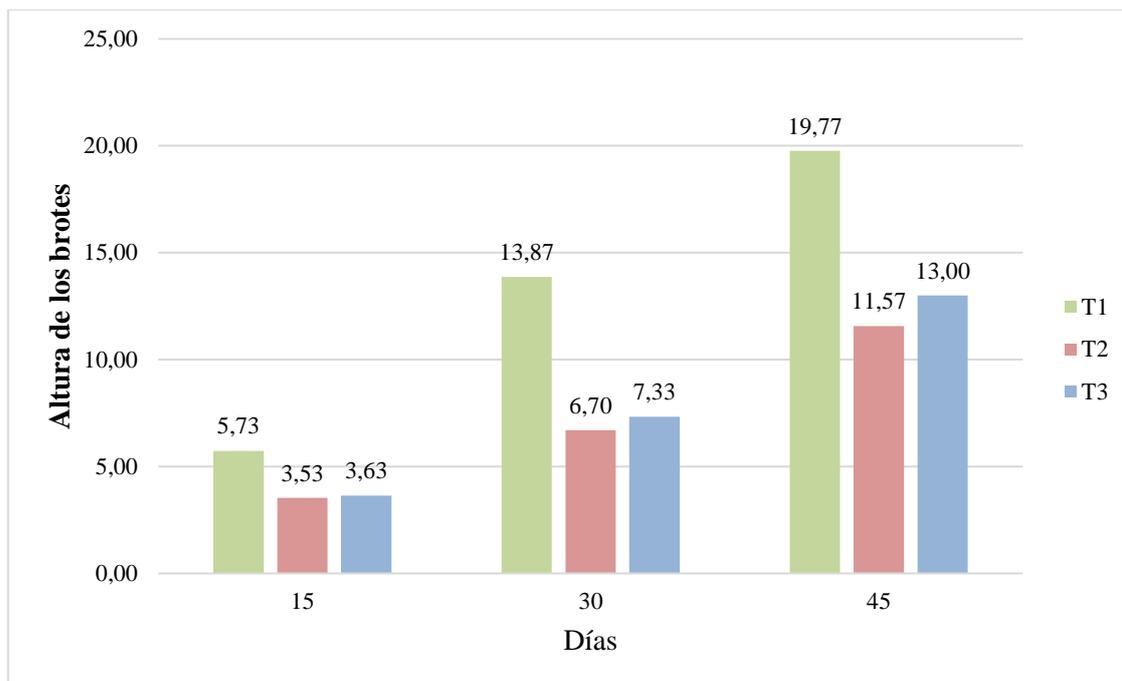


Ilustración 17-4: Altura de los brotes a los 15, 20 y 45 días de cada tratamiento.

Realizado por: Bonilla, A., 2023

Como se observa en la ilustración 17-4 la altura de los brotes a los 15 días, el tratamiento 1 (protocolo 1) obtuvo un promedio mayor de 5,73 cm, el tratamiento 3 (protocolo 3) con un promedio de 3,67 cm y el tratamiento 2 (protocolo 2) con un promedio de 3,53 cm. A los 30 días el tratamiento 1 (protocolo 1) obtuvo un promedio mayor de 13,87 cm, el tratamiento 3 con un promedio de 7,33 cm y el tratamiento 2 (protocolo 2) con un promedio de 6,70 cm. A los 45 días, el tratamiento 1 (protocolo 1) obtuvo un promedio mayor de 19,77 cm, el tratamiento 3 (protocolo 3) con un promedio de 13,00 cm y el por último el tratamiento 2 (protocolo 2) con un promedio de 11,57 cm.

Tabla 20-4: Análisis de varianza de la altura de los brotes asociadas a segmentos nodales de *Rubus glaucus* Benth, luego del establecimiento *in vitro* en el laboratorio a los 15 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr(>F)
Tratamientos	2	0,04116	0,02058	0,898	0,476
Bloque	2	0,12172	0,06086	2,657	0,184
Error	4	0,09161	0,02290		

Realizado por: Bonilla, A., 2023

El análisis de varianza (ANOVA) indicó que a los 15 días no existieron diferencias significativas en los tratamientos ($P>0,05$), demostrando que no hubo efecto de los diferentes protocolos sobre la altura de los brotes para el establecimiento *in vitro* a partir de los segmentos nodales de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) (tabla 20-4).

Tabla 21-4: Análisis de varianza de la altura de los brotes asociados a segmentos nodales de *Rubus glaucus* Benth, luego del establecimiento *in vitro* en el laboratorio a los 30 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr(>F)
Tratamientos	2	0,4198	0,20988	5,754	0,0665
Bloque	2	0,2658	0,13290	3,644	0,1256
Error	4	0,1459	0,03647		

Realizado por: Bonilla, A., 2023

El análisis de varianza (ANOVA) indicó que a los 30 días no existieron diferencias significativas en los tratamientos ($P>0,05$), demostrando que no hubo efecto de los diferentes protocolos sobre la altura de los brotes para el establecimiento *in vitro* a partir de los segmentos nodales de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) (tabla 21-4).

Tabla 22-4: Análisis de varianza de la altura de los brotes asociadas a segmentos nodales de *Rubus glaucus* Benth, luego del establecimiento *in vitro* en el laboratorio a los 45 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr(>F)
Tratamientos	2	0,5115	0,25574	3,434	0,135
Bloque	2	0,4795	0,23974	3,219	0,147
Error	4	0,2979	0,07448		

Realizado por: Bonilla, A., 2023

El análisis de varianza (ANOVA) indicó que a los 45 días no existieron diferencias significativas en los tratamientos ($P>0,05$), demostrando que no hubo efecto de los diferentes protocolos sobre la altura de los brotes para el establecimiento *in vitro* a partir de los segmentos nodales de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) (tabla 22-4).

4.6. Número de segmentos nodales brotados para la multiplicación



Ilustración 18-4: Numero de segmentos nodales brotados para sus multiplicaciones de cada tratamiento.

Realizado por: Bonilla, Abigail, 2023

Como se puede observar en la ilustración 18-4, el segmento nodal brotado fue utilizado para la multiplicación el cual obtuvo floración y al tomar en cuenta la altura de 1,5 cm, se procedió a multiplicar una sola yema, la misma que fue introducida en el tubo de ensayo, para luego llevar al cuarto de incubación. Este procedimiento se realizó con todos los brotes botados tomando en cuenta la altura (Tabla 20-4), (Tabla 21-4) y (Tabla 22-4).

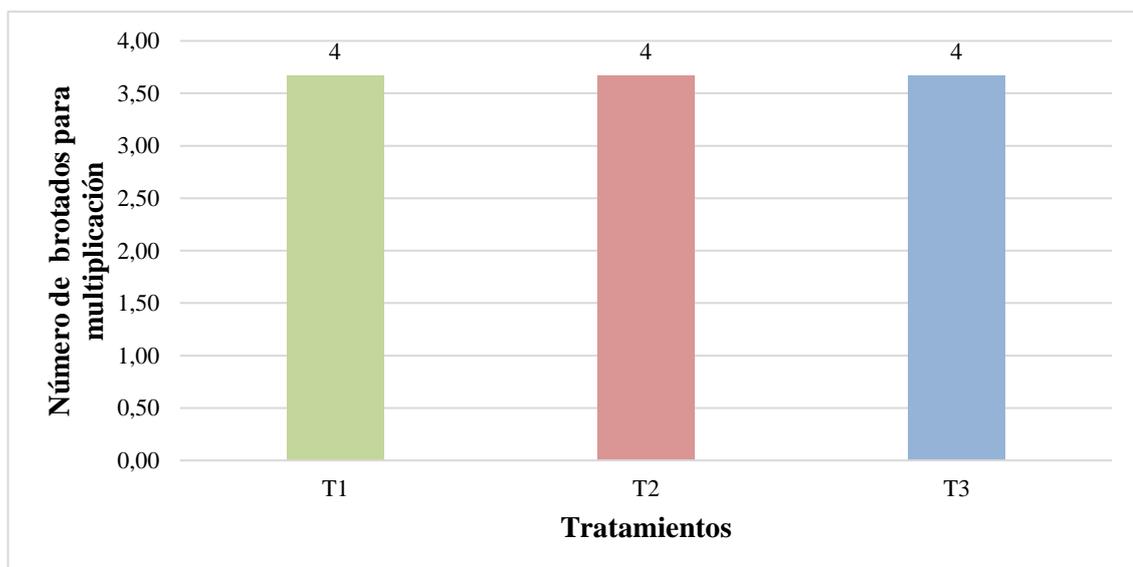


Ilustración 18-4: Numero de segmentos nodales brotados para las multiplicaciones de cada tratamiento.

Realizado por: Bonilla, A., 2023

Como se puede observar en la ilustración 18-4 el número de segmentos nodales brotados para la multiplicación, en los tres tratamientos tienen el mismo promedio de 4 brotes, es decir que el número de segmentos brotados en cada tratamiento tenían la misma cantidad.

Tabla 23-4: Análisis de varianza del número de segmentos nodales brotados para sus multiplicaciones, asociadas a segmentos nodales de *Rubus glaucus* Benth, luego del proceso de la multiplicación *in vitro*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr(>F)
Tratamientos	2	0,00000	0,000000	0,0	1,000
Bloque	2	0,00889	0,004444	0,4	0,694
Error	4	0,04444	0,011111		

Realizado por: Bonilla, A., 2023

El análisis de varianza (ANOVA) indicó que a los 45 días no existieron diferencias significativas en los tratamientos ($P > 0,05$), demostrando que no hubo efecto de los diferentes protocolos sobre el número de segmentos nodales brotados para su multiplicación, para el establecimiento *in vitro* a partir de los segmentos nodales de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) (tabla 23-4).

4.7. Altura de las primeras yemas multiplicadas



Ilustración 19-4: Alturas de las primeras yemas multiplicadas a los 15 días.

Realizado por: Bonilla, Abigail, 2023

Como se puede observar en la ilustración 19-4 la altura de las primeras yemas multiplicadas a los 15 días, su altura varía según el tratamiento.

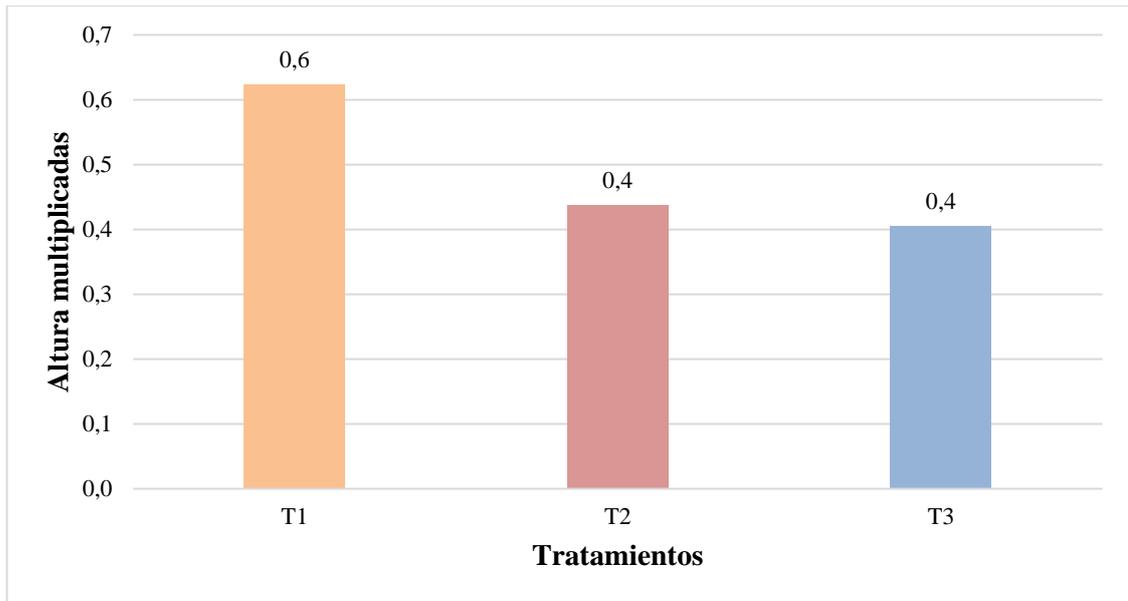


Ilustración 20-4: Alturas de los explantes multiplicados a los 15 días de cada tratamiento.

Realizado por: Bonilla, A., 2023

Las alturas de las primeras yemas multiplicadas a los 15 días, el tratamiento 1 tuvo mayor promedio de 0,6 cm, mientras que el tratamiento 2 y tratamiento 3 tuvo menor promedio de 0,4 cm (Ilustración 20-4).

Tabla 24-4: Análisis de varianza de las alturas de las primeras yemas multiplicadas de *Rubus glaucus* Benth, luego de la multiplicación *in vitro* en el laboratorio a los 15 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr(>F)
Tratamientos	2	0,08359	0,04180	12,338	0,0195*
Bloque	2	0,02440	0,01220	3,602	0,1275
Error	4	0,01355	0,00339		

Realizado por: Bonilla, A., 2023

El análisis de varianza (ANOVA) indicó que a los 15 días si existieron diferencias significativas en los tratamientos ($P < 0,05$), demostrando que si existió efecto de los diferentes protocolos para el establecimiento *in vitro* de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), sobre la altura de las primeras yemas multiplicadas de los segmentos nodales (tabla 24-4).

Tabla 25-4: Test de Tukey al 5% de las alturas de las primeras yemas multiplicadas a los 15 días de *Rubus glaucus* Benth, luego del proceso de multiplicación *in vitro* en el laboratorio.

Tratamientos	Media	Rango de significancia
1	0,62	a
2	0,44	b
3	0,41	b

*Letras diferentes denotan diferencias estadísticas significativas según el Test de Tukey al 5%

Realizado por: Bonilla, A., 2023

La prueba Tukey al 5% para la variable alturas de las primeras yemas multiplicadas a los 15 días, mostro 3 grupos estadísticos; en el grupo a se encuentra el tratamiento 1; en el grupo b se encuentra el tratamiento 2 y el tratamiento 3. El tratamiento 1 presentó mayor promedio en altura (0,62) y el tratamiento 3 presentó menor promedio en altura (0,44) (Tabla 25-4).

4.8. Discusión

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. Teniendo como objetivo comprobar la eficiencia del protocolo de desinfección, se realizó un análisis de porcentajes de contaminación, mediante una fórmula se pudo conocer cuál fue el tratamiento que más contaminación tuvo.

En la evaluación realizada a los 8, 16,24 y 32 días el tratamiento 1 (Protocolo 1) (Hipoclorito de sodio 1% sumergido a 10 min y Alcohol al 70% sumergido a 1 min) tuvo mayor porcentaje de contaminación (Ilustración 9-4), estos resultados concuerdan con Guamán (2018, p. 29), quien menciona que el tratamiento (Hipoclorito de sodio 30% sumergido a 10 min y alcohol 70% sumergido a 1 min) presentó mayor contaminación en el cultivo de mora de castilla *Rubus glaucus* Benth y de igual manera el tratamiento 2 (Protocolo 2) (Hipoclorito sumergido al 1% sumergido a los 5 min y Alcohol al 70% sumergido a los 30 s) observado a los 8, 16,24 y 32 días tuvo el menor porcentaje de contaminación siendo el mejor tratamiento (Ilustración 9-4), estos resultados concuerdan con Guamán (2022, p 65) ya que menciona que al sumergir los segmentos nodales de *Vaccinium corymbosum* L. (Var. Emerald) en la solución de hipoclorito en diferentes concentraciones de 1, 3 y 5 % presentó una menor incidencia de porcentaje de contaminación en los diferentes tiempos de 1, 3 y 5 min, sin embargo el mismo autor menciona que a los 14 días la concentración de hipoclorito de sodio al 3% redujo el porcentaje de contaminación, es por ello

que García, et, at, (2009, p.131) menciona que a medida que aumentan la concentración y el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio disminuyen el porcentaje de contaminación.

En la mayoría de los tratamientos y de repeticiones que fueron realizadas se obtuvo aproximadamente un 90% de contaminación por hongo de manera endógena y un 10% de bacterias, es por ello que en la micropropagación de hortensia (*Hydrangea macrophylla*) propuesta por Orozco (2012, p. 73) menciona que existió mayor porcentaje de contaminación por hongo que por bacteria la cual fue muy baja en todos los tratamientos. Los contaminantes endógenos se dan por lo general en cultivos que se realizan a partir de explantes que son tomados de árboles adultos crecidos en campo y propagados vegetativamente en el cultivo de mora *Rubus glaucus* Benth (Orozco, 2012 citado en Guamán, 2018, p. 29). El efecto que causa su presencia es la disminución del crecimiento y reducción de la capacidad organogénica en la formación de nuevas raíces y brotes adventicios (Orozco, 2012, p.73).

La contaminación se presentó después del establecimiento *in vitro* incluso a los 40 días se pudo observar que el tratamiento 1 (protocolo 1) obtuvo mayor porcentaje de contaminación a pesar de que el tiempo transcurría seguía contaminándose estos resultados concuerda con Scherwinski-Pereira y da Silva (2010) citado en Díaz et al (2020, p. 3) lo cual menciona que la contaminación puede aparecer inmediatamente después del establecimiento del explante en el medio de cultivo o permanecer en modo de latencia, en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Handroanthus heptaphyllus* de flores blancas. Los hongos pueden sobrevivir y adaptarse a ambientes demasiado hostiles, es por ello que en los resultados obtenidos en cuanto a la contaminación por hongo un factor importante para que exista la contaminación fue por el pH que fue ajustado de 5,5, resultados que concuerdan con Totorá, Funke, & Case, (2007) citado en Orozco (2012, p.73) en el cultivo de mora *Rubus glaucus* Benth menciona los hongos toleran variaciones de pH en especial ácidas en donde no pueden crecer la mayoría de las bacterias, resisten mayor presión osmótica por lo tanto pueden desarrollarse en concentraciones relativamente elevadas de azúcares o sales, soportan medios con un contenido que puede ser muy bajo de humedad, por ello requieren menores cantidades de nitrógeno como la lignina (Totorá, Funke, & Case, 2007 citado en Orozco, 2012, p.73).

Guamán, (2018, p 20-21) menciona que el cultivo de tejidos vegetales tendrá éxito cuando se logre controlar la contaminación microbiana, ya que es uno de los problemas que más frecuentemente existe en la propagación *in vitro*. Tomando en cuenta los hongos filamentosos y bacterias son los hongos más comunes, los mismos que paralizan el desarrollo de las vitroplantas al colonizar y destruir sus tejidos.

Para controlar la contaminación *in vitro* es por medio de la fase preparativa de las plantas madre, es por ello que en los tres tratamientos (protocolos) se utilizó fungicidas carbendazim y phyton en dosis de 1 cc/L, estos resultados concuerda con Orozco (2012, p.76) la cual menciona que es un punto exacto donde se aspergea una serie de bactericidas y fungicidas, es aquí donde se puede tomar en cuenta una mayor aplicación de tratamientos en contra de los hongos, o tratar con otro tipo de químicos que posiblemente tengan ingredientes activos más fuertes y de mayor concentración en su formulación.

La oxidación es un proceso por el cual un átomo pierde uno o más electrones es decir que se oxida y los cede a otro el cual se considera reducido, por tanto la oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro* se lo puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para posterior a ello producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Azofeifa, 2009, p.154). Como se evidencio a los 32 días si existió diferencias significativas en los tratamientos ($P < 0,05$), demostrando que si existió efecto de los diferentes protocolos sobre los niveles de oxidación de los segmentos nodales para el establecimiento *in vitro* de la mora de castilla, es por ello que el tratamiento 1 (protocolo 1) presentó el menor nivel de oxidación y el tratamiento 2 (protocolo 2) presentó mayor nivel oxidación, esto se debe a que no se estandarizo el tamaño y el diámetro de los segmentos nodales y por ende al momento de ser cortados los segmentos nodales sufrieron una herida lo cual produjo la necrosis y por lo tanto la muerte del segmento nodal (Ilustración 11-4), eso resultados concuerda con Vaca (2012, p. 20) quien menciona que algunas plantas durante el cultivo *in vitro* sufren heridas que producen exudados de color marrón o negro, esto se debe al producto de la liberación y oxidación de polifenoles y taninos, que a su vez llegan a ser compuestos quinónicos que son tóxicos y por lo general afectan al crecimiento y desarrollo de las plantas, llegando a casos en la que la planta puede morir. Por otro lado, los desinfectantes utilizados en el cultivo de tejidos tienden a ser abrasivos, por lo que el tiempo de exposición del explante a estos es de mucha importancia debido a que puede causar un grado de daño quemándolo y provocando su muerte por necrosis (Guamán, 2018, p 20-21).

En el tiempo de brotación el tratamiento cuyas yemas se demoraron en emerger fue el tratamiento 3 con un promedio de 8,89, y las yemas que menos se demoró en emerger fue el tratamiento 2 (protocolo 2) con un promedio de 8,98 (Ilustración 13-4) estos resultados concuerdan con Remache (2011, p. 35) ya que menciona que los protocolos de desinfección que fueron utilizados influyen en el desarrollo de los brotes, tomando en cuenta que los tratamientos se adaptaron a la fase de

establecimiento *in vitro*. Por otro lado, Camargo y Pasqual, 1999 citado en Díaz et al (2020, p. 3) indica que el uso de hipoclorito puede inhibir el crecimiento y provoca la muerte del explante en otras especies.

El mayor número de brotes obtenidos a los 15, 30 y 45 días, fue el tratamiento 1 (protocolo 1) y el tratamiento 2 (protocolo 2) obtenidos a los 15, 30 y 45 días obtuvo menor número de brotes, es por ello que la concentración de auxinas es bajo y por ende no permiten el desarrollo de los brotes, estos resultados no concuerdan con Guamán (2022, p 81) menciona que el uso de auxinas AIA (0,5 y 1 ppm), ANA (0,05-0,1-0,5 ppm) y el tratamiento de control permitieron el desarrollo de mayor número de yemas por planta al resto de tratamientos.

Mayor altura de brotes obtenidos a los 15, 30 y 45 días fue el tratamiento 1 (protocolo 1) y el que obtuvo menor altura de brotes fue tratamiento 2 (protocolo 2), al emplear las mismas concentraciones de hormonas y vitamina en los tres tratamientos, estos resultados concuerdan con Guamán (2018, p 20-21) menciona que los reguladores empleados y la combinación adecuada entre BAP Y GA₃, son aquellos que incrementan el crecimiento y brotación de la planta, es decir que al a ver estos medios de cultivo en mayor concentración, contribuyen a mayor altura de los brotes.

En cuanto al número de segmentos nodales brotados para su multiplicación no existe diferencia significativa en los tratamientos, ya que los tres tratamientos (protocolos) tienen el mismo promedio de 3,67, es decir que el número de segmentos brotados en cada tratamiento tenían la misma cantidad (Ilustración 18-4), ya que los reguladores de crecimiento y vitaminas en combinación tuvieron la misma concentración en los tres tratamientos, estos resultados concuerdan con Roca & Mroginsky, (1993) citado en; Orozco,(2012, p.28) que al combinar los medios de cultivo con los reguladores de crecimiento que se utilizó en esta etapa, interactúan para inducir la brotación en los explantes procedentes del establecimiento, ya que cada brote obtenido representa una nueva planta que puede ingresar a un proceso de propagación repetidamente, obteniéndose más generaciones y más clones. Por lo tanto, este proceso de multiplicación se puede repetir hasta alcanzar el número requerido de plántulas y finalmente proceder con el enraizamiento que es la siguiente etapa.

Las alturas de las primeras yemas multiplicadas a los 15 días, si existieron diferencias significativas en los tratamientos ($P < 0,05$), demostrando que si existió efecto de los diferentes protocolos para el establecimiento *in vitro* de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), sobre la altura de las primeras yemas multiplicadas de los segmentos nodales (tabla 23-4) sin embargo, el tratamiento 1 (protocolo 1) tuvo mayor promedio de 0,6 y el tratamiento 3 (protocolo 3) tuvo

menor promedio de 0,4 (Ilustración 20-4), estos resultados concuerdan con los resultados de (Cancino, 2015, p. 7-15), quien demostró que si existe diferencia significativa en cuanto a la altura de yemas brotadas observándose mejores resultados en los medios de GA₃ en una menor concentración y en el medio de igual concentración de BAP. Por otro lado, la multiplicación por medio del método de yemas axilares es la que posibilita la mayor estabilidad genética en las plantas producidas y puede ser alcanzada más fácilmente en la mayoría de las especies (Pérez, 1998; citado en: Orozco, 2012, p.28)

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en la presente investigación, se determinó que el tratamiento 1 (*protocolo 1*) presentó el menor nivel de oxidación y además presentó una mayor altura de los explantes multiplicados siendo este el protocolo más adecuado para el establecimiento *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) a partir de segmentos nodales.

El tratamiento 1 (protocolo 1) tuvo mayor efecto en la altura de los explantes multiplicados de mora de castilla dado que, las concentraciones de hormonas y vitaminas utilizadas que en marca este protocolo contribuyó a obtener un mayor resultado.

En los indicadores: Porcentaje de contaminación, tiempo de brotación, número de brotes, altura de brotes, número de brotes para multiplicar, no presentaron diferencia significativa.

5.2. Recomendaciones

Probar diferentes concentraciones de pantetonato, IBA, BAP y GA3 para el establecimiento in vitro de segmentos nodales en el cultivo de mora de castilla.

Evaluar otros desinfectantes y antioxidantes a diferentes tiempos y dosis para la inmersión de los segmentos nodales de la mora de castilla.

Estudiar otros tipos de explantes como: meristemas, yemas apicales con los distintos protocolos utilizados en el presente estudio.

Se recomienda utilizar el tratamiento 1 (protocolo 1) para el establecimiento in vitro de segmentos nodales en el cultivo de mora de castilla.

GLOSARIO

Establecimiento: consiste en la desinfección de los explantos generalmente con hipoclorito de sodio y su posterior adaptación al medio artificial de modo de inducir callo, brote, raíz o embrión somático según se desee (Segretín, s.f, p.2).

Explante: Cultivar algunas partes de las plantas, como segmentos de hoja, tallo y raíces, además de otros tejidos u órganos vegetales, dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial, en los que debe de controlarse la asepsia, el crecimiento y el desarrollo de estos diferentes tejidos (Salgado, 2019, p.1).

Segmento nodal: porción de una rama entre nodos sucesivos o ramas laterales (Carmona, et al, 2004, p.13)

Esquejes: son partes vivas que se extraen de una planta sana para injertarlas en otras o en una maceta para que se desarrolle (Almería, 2023, p.1).

Multiplificación: es una multiplicación asexual, que se realiza por la separación de alguno de los órganos de la planta, que se convierte en una planta entera. Se consiguen individuos que presentan todas las características de la planta madre de la cual proceden (Calderón, 2005, p.3).

Brote: Esta formado por un eje central llamado tallo, y componentes que crecen desde lugares específicos en ese tallo (Michaels, 2022, p.1).

Yemas: es un rudimento de vástago, el ápice caulinar está protegido por una o más hojas modificadas denominadas tegmentos, que en conjunto constituyen la pérula (Troiani, 2017, p. 43).

Ágamo: sin gametos consiste en la reproducción de las plantas mediante semillas, pero sin que el embrión se haya originado por una fecundación, o sea, sin procesos sexuales (Troiani, 2017, p. 43).

Meristemo: todo tejido cuyas células crecen y se multiplican (Carmona, et al, 2004, p.13).

Vástago: el cuerpo de una planta superior, esta polarizado en un órgano subterráneo, la raíz y en una parte aérea con dos órganos, el tallo y las hojas, que en conjunto constituyen el vástago (Troiani, 2017, p. 43).

Callo: son un grupo de células con alta división celular que han perdido el control de la diferenciación, el cual crece de forma continua en forma de cúmulos celulares, a partir de los cuales pueden formarse brotes o embriones somáticos (Salgado, 2019, p.1).

Totipotencia: células capaces de regenerar toda la planta, ya que tiene la potencialidad de dar cualquier órgano o tejido vegetal que se requiera (Contreras, 2013, p.1).

Tejidos vegetales: son agrupaciones de células especializadas que forman los diversos órganos de las plantas (Gelambi, 2022, p.1).

Organogénesis: es un proceso bifásico, según los estudios de la formación de órganos a partir del cultivo de callos (Pérez, et al, p.1).

Embriogénesis somática: es un proceso biológico por el cual células somáticas desarrollan embriones semejantes a los embriones cigóticos, estos embriones se regeneran en plantas genéticamente iguales a la planta madre (Sánchez, et al, 2019, p.1).

Subcultivo: Trasplante de células de un envase de cultivo a otro u otros (Brito, 2010, p.6).

BIBLIOGRAFÍA

ALMERIA. *Sistemas Hortícolas Almería..* Esquejes: Todo lo que necesitas saber. [en línea]. [Consulta: 12 Enero 2023]. Disponible en: <https://www.sistemashorticolasalmeria.com/blog/esquejes/>.

ALVAREZ JAEL, Pozo Marco. Desarrollo de un protocolo para el cultivo in vitro de rosa chinensis [en línea], (Trabajo de titulación) (Ingeniería) Universidad politecnica salesiana sede quito, Quito. 2021. p. 13 [Consulta: 2022-11-03]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/19601/1/UPS-TTQ185.pdf>

AZOFEIFA, A. "Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes in vitro". *Revista Agronomía mesoamericana* [en línea], 2009, (Costa Rica) 20(1), pp. 153-175. [Consulta: 3 Febrero 2023]. Disponible en: https://www.mag.go.cr/rev_meso/v20n01_153.pdf

BRITO, L. Aspectos básicos sobre el manejo y preservación de los cultivos celulares. 2010. p. 6. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2010/L%20Brito%20INHRR.pdf>.

CALAPIÑA, O. Propagación in vitro del cultivo de mora sin espinas (*Rubus glaucus* Benth) en el cantón Cevallos provincia Tungurahua [en línea] (Proyecto de investigación) (Ingeniería) Universidad técnica de Cotopaxi, Ecuador, 2020. p. 7. [Consulta: 2022-11-05]. Disponible en: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/6930/1/UTC-PIM-000271.pdf>

CALDERÓN, E. II Curso básico de multiplicación de plantas. [en línea] 2005. [Citado el: 12 Enero 2023]. Disponible en: <file:///C:/Users/HP/Downloads/ii%20curso%20multiplicacion%20plantas.pdf>.

CANCINO, G., et al. "Propagación in vitro de materiales seleccionados de *Rubus glaucus* Benth (mora de castilla) en la provincia de Pamplona región nororiental de Colombia". *Revista Colombiana Biotecnol* [en línea], 2015, (Colombia) 17(2), pp. 7-15. [Consulta: 05 Noviembre 2022.]. Disponible en: file:///C:/Users/HP/Downloads/Propagacion_in_vitro_de_materiales_selec.pdf.

CÁRDENAS ANGÉLICA., Rosita Espinoza. La guía práctica de cultivo in vitro de especies vegetales. [en línea], (Trabajo de investigación documental) (Ingeniería) Universidad Politécnica

Salesiana. 2014. p. 76. [Consulta:2022-11-05]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9611/1/UPS-QT07914.pdf>

CARMONA, J.; HERNÁNDEZ, M.; RAMÍREZ, M . *Algas glosario Ilustrado*. [en línea]. Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México Primera edición, 2004. [Consulta: 12 Enero 2023]. Disponible en: <http://www.libros.unam.mx/digital/V8/31.pdf>

CARRETO MONTOYA, Lorena. Establecimiento de cultivos in vitro y de estacas para la propagacion de Acer negundo L. [en línea], (Trabajo de titulación) (Maestría) Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, Michoacán, 2017. pp. 23-26, [Consulta: 2022-10-2022]. Disponible en: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/410/1/111219220807102417.pdf>.

CASTILLO, A. "Propagación de plantas por cultivo in vitro:una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo". *INIA las brujas* [en línea], 2020. [Consulta: 05 Noviembre 2022]. Disponible en: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/410/1/111219220807102417.pdf>.

CAVAZOS GALINDO, Jaime. Propagacion in vitro de los cultivares de vid (vitis vinifera L) cabernet sauvignon y merlot. [en línea], (Trabajo de titulación) (Maestría) Universidad Autonoma de Nuevo León, México, 2017. p. 24. [Consulta:2022-10-25]. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/14219/1/1080242911.pdf>

CONTRERAS, Ramón. *La totipotencia en cultivos de tejidos vegetal* [blog]. [Consulta: 3 Febrero 2023]. Disponible en: <https://biologia.laguia2000.com/botanica/la-totipotencia-en-cultivos-de-tejido-vegetales>

CUCHUT JEANNET, Murillo Rafael. "Efecto de tres concentraciones de carbon activado y diferentes fuentes de carbono, en multiplicacion de vitroplantas de Papa Imilla Negra (Solanum tuberosum L. Ssp. Andigena)". Revista de la carrera de Ingeniería Agronómica-UMSA[en línea], 2019 5(2), p.1618 [Consulta: 05 de Noviembre de 2022]. ISSN: 2519-9382. Disponible en: <https://aphapi.umsa.bo/index.php/ATP/article/view/12/10>.

DÍAZ, M., et al. "Establecimiento in vitro de segmentos nodales de Handroanthus heptaphyllus de flores blancas". *SciELO.sld.cu* [en línea], 2020, (Cuba) 11(1), p. 3.[Consulta: 12 de Febrero de 2023]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2074-86472020000300203#:~:text=Los%20segmentos%20nodales%20fueron%20tomados,al%2010%25%20durante%205%20min..

GALLIANIA, Claudia. *Cultivo de tejidos vegetales*. 2020. [blog]. [Consulta: 25 de Octubre de 2022.]. Disponible en: <https://biologia.laguia2000.com/botanica/la-totipotencia-en-cultivos-de-tejido-vegetales>

GARCIA, M., et al. "Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo in vitro de clon caraqueño". *Revista Colombiana Biotecnol* [en línea], 2009. (Cuba) 11(2), pp. 127-135. [Consulta: 12 Febrero 2023.] Disponible en: [file:///C:/Users/HP/Downloads/Dialnet-UsodeDistintosTratamientosDeDesinfeccionEnElCultiv-3105408%20\(4\).pdf](file:///C:/Users/HP/Downloads/Dialnet-UsodeDistintosTratamientosDeDesinfeccionEnElCultiv-3105408%20(4).pdf).

GARZÓN, L., et al. *Cultivo de tejido vegetal. Desarrollo de bioproductos para los sectores salud, agropecuario y cosmético, como resultado del estudio de la biodiversidad colombiana*. Colombia 2018. [Consulta: 23 Octubre 2022.] Disponible en: http://bio.uis.edu.co/eisi/images/Noticias/archivos/20201115104940-anexo_d_cartilla_cultivo_1.pdf

GELAMBI, Mariana. *Tejidos vegetales: características, clasificación y funciones* [blog]. [Consulta: 3 Febrero 2023]. Disponible en: <https://www.lifeder.com/tejidos-vegetales/>

GUAMÁN CARRASCO, Darío. Desarrollo de un protocolo de establecimiento in vitro de mora de castilla *Rubus glaucus* Benth [en línea], (Trabajo de titulación) (Ingeniería) Universidad técnica de Ambato. 2018. Ecuador, 2017. p. 24. [Consulta:2022-11-05]. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/27506/1/BQ%20147.pdf>

GUAMÁN QUISPE, José. Establecimiento de segmentos nodales de *Vaccinium corymbosum* L. (Var. Emerald), en dos medios de cultivo mediante el manejo de factores de ecosistema in vitro [en línea], (Trabajo de titulación) (Ingeniería) Universidad Técnica de Ambato. Ecuador. 2022. p. 68. [Consulta:2023-02-12]. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/36532/1/Tesis-331%20%20Ingenier%c3%ada%20Agron%c3%b3mica%20-%20Guam%c3%a1n%20Quispe%20Jos%c3%a9%20Manuel.pdf>

HERNÁNDEZ, C., et al. "Desarrollo de un protocolo para la propagación masiva de la mora de castilla(*Rubus glaucus* Bent) mediante la utilización del cultivo de tejidos". *Revista Actualidades Biológicas* [en línea], 2017 (Colombia) 21 (70), pp. 3-12. [Consulta: 21 Octubre 2022.]. Disponible en: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/actbio/article/view/329760/20786096>

INIAP. *El cultivo de la mora en Ecuador* [en línea]. Ecuador, 2016. [Consulta: 05 Noviembre 2022]. Disponible en: <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/4066/1/iniapscCD104p105.pdf>

IZA, M., et al. "Diferenciación morfológica, fenológica y pomológica de cultivares comerciales de mora (*Rubus glaucus* Benth)". *Revista UTE* [PDF en línea], 2020, (Ecuador) 11(2), pp 47-57. [Consulta: 21 Octubre 2022]. Disponible en: <https://ingenieria.ute.edu.ec/enfoqueute/index.php/revista/article/view/529/620>

MARTÍNEZ, Ana. Cultivo in vitro de plantas para la obtención de una colección de cultivares de Olivos libres de patógenos [en línea], (Trabajo de titulación) (Ingeniería) Universidad de JAÉN, 2020. pp. 17-18. [Consulta: 2022-10-23]. Disponible en: <https://tauja.ujaen.es/bitstream/10953.1/12294/1/TFG%20MartInez%20Trinidad%20%20Ana.pdf>

MARTÍNEZ, A., et al. "Evaluación de nuevas tecnologías de producción limpia de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth)", en la zona Andina de Ecuador, para un buen vivir de los fruticultores". *Scielo.org.bo* [en línea], 2019, (Ecuador) 7(1). [Consulta: 08 Octubre 2022]. ISSN 2308-3859. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-38592019000100007&lng=es&nrm=iso.

MICHAELS, T., et al. *La ciencia de las plantas: comprensión de las plantas y como crecen.* [blog]. [Consulta: 12 Enero 2023.]. Disponible en: [https://espanol.libretexts.org/Biologia/Bot%C3%A1nica/La_ciencia_de_las_plantas%3A_comprensi%C3%B3n_de_las_plantas_y_c%C3%B3mo_crecen_\(Michaels_et_al.\)%3A_C%C3%B3mo_crecen_las_plantas%2C_Parte_1%3A_02%3A_Brotos](https://espanol.libretexts.org/Biologia/Bot%C3%A1nica/La_ciencia_de_las_plantas%3A_comprensi%C3%B3n_de_las_plantas_y_c%C3%B3mo_crecen_(Michaels_et_al.)%3A_C%C3%B3mo_crecen_las_plantas%2C_Parte_1%3A_02%3A_Brotos).

OROZCO FREIRE, Wilson. Establecimiento del protocolo de micropropagación de hortensias 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 Quito [en línea], (Trabajo de titulación) (Ingeniería) Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador, 2012. p. 73. [Consulta: 2023-02-03]. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/6227/T-ESPE-034952.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

PARAMO CABRERA, Carlos. Estudio del efecto hormético y antimicrobiano de nanopláta en la regeneración in vitro en mora de castilla [en línea], (Trabajo de titulación) (Ingeniería)

Universidad de las fuerzas armadas, Ecuador, 2018. p. 6. [Consulta: 2022-11-05]. Disponible en: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/14243/1/T-IASA%20I-005429.pdf>

PEREZ, M., et al. "Organogenesis indirecta a partir de meristemas apicales caulinares de la variedad cubana de arroz reforma". *Scielo.org.bo* [en línea], 2008, 29(1), p. 23-28. [Consulta: 03 de Febrero de 2023]. Disponible: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362008000100004#:~:text=La%20organog%C3%A9nesis%20es%20un%20proceso,partir%20del%20primordio%20\(9\).](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362008000100004#:~:text=La%20organog%C3%A9nesis%20es%20un%20proceso,partir%20del%20primordio%20(9).)

RIBÓN ANNGY, Bernal Ingry. Protocolo de establecimiento in vitro de segmentos nodales de arandano azul [en línea], (Trabajo de titulación) (Ingeniería) Universidad distrital francisco José de Caldas, Bogota, 2020. pp. 25-30. [Consulta: 2022-11-03]. Disponible en: <https://repository.udistrital.edu.co/bitstream/handle/11349/25242/Rib%C3%B3nBarraganAnngyYurani%26BernalP%C3%A9rezIngryJohanna2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

RONQUILLO LÓPEZ, Maria. Inducción de callogénesis in vitro a partir de láminas foliares de *Sansevieria trifasciata* [en línea], (Trabajo de titulación) (Ingeniería). Zamorano, Honduras, 2005. p. 6. [Consulta: 2022-11-03]. Disponible en: <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/2239ad4e-c025-46b9-b515-fcb5fe77ad55/content>

SALGADO GARCIGLIA, Rafael. "La propagacion de plantas in vitro, un exito biotecnologico". *Revista de divulgación* [en línea], (México) 2019, p. 1. [Consulta: 12 Enero 2023.]. Disponible en: <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/75-numero-10/153-la-propagacion-de-plantas-in-vitro-un-exito-biotecnologico.html#:~:text=El%20t%C3%A9rmino%20E2%80%9Ccultivo%20in%20vitro,c ontrolarse%20la%20asepsia%2C%20el%20crecimiento>

SEGRETÍN, M. "Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales)". *ArgenBio* [en línea], p. 2. [Consulta: 12 Enero 2023]. Disponible en: https://www.argenbio.org/images/La_biotecnologia/Cap_2/Cultivos_celulares_II.pdf

SÁNCHEZ, J., et al. "Introducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares en tres variedades de café". *Scielo.org.pe* [en línea], 2019, (Perú), 10(2). p. 1. [Consulta: 12 Febrero 2023]. ISSN 2077-9917. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-

VEGA QUESPAZ, Carolina. Estudio de linea base y diagnostico del cultivo de mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth) en Angamarca, Cotopaxi [En línea] (Trabajo de Titulación) (Ingeniería) Universidad central del Ecuador. 2018. p. 2. [Consulta: 2022-11-05]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/16840/1/T-UCE-0004-CAG-029.pdf>

VILLALBA, R., ET AL. *Produccion limpia cultivo de la mora (Rubus glaucus) en el departamento del huila* [En línea]. 2020. p. 4. [Consulta: 21 de Octubre de 2022.]. Disponible en: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Mora/Normatividad/9.%20Manual%20tecnico%20cultivo%20de%20la%20mora%20en%20el%20Huila.pdf>

ANEXOS



D.B.R.A.
Ing. Gaspar Castillo



ANEXOS

ANEXO A: COMPOSICIÓN DEL MEDIO BASE MURASHIGE Y SKOOG (AÑO 1962)

Componente	Formula	Cantidad (mg/l)
Macronutrientes	$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	1,650.0
	KNO_3	1,900.0
	$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	170.0
	$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.0
	$\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.0
Micronutrientes	KI	0.830
	H_3BO_3	6.200
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.900
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.600
	$\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
	$\text{Co Cl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.025
Hierro	$\text{Fe SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	27.8
	$\text{Na}_2 \text{- EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	37.3
Vitaminas	Ac. Nicotínico	0.5
	Piridoxina	0.5
	Tiamina	0.4
	Inositol	100.00
	Sacarosa	30000.00
	Phytigel	1800.00
pH	5.8	

Fuente: Ronquillo, 2005

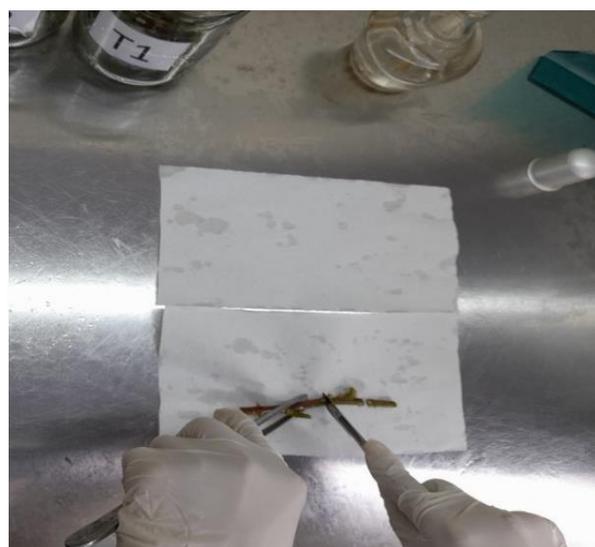
ANEXO B: PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN

Medio de cultivo dispensado en los tubos de ensayo con la ayuda de una jeringuilla de 60 mL.



ANEXO C: ESTABLECIMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL IN VITRO

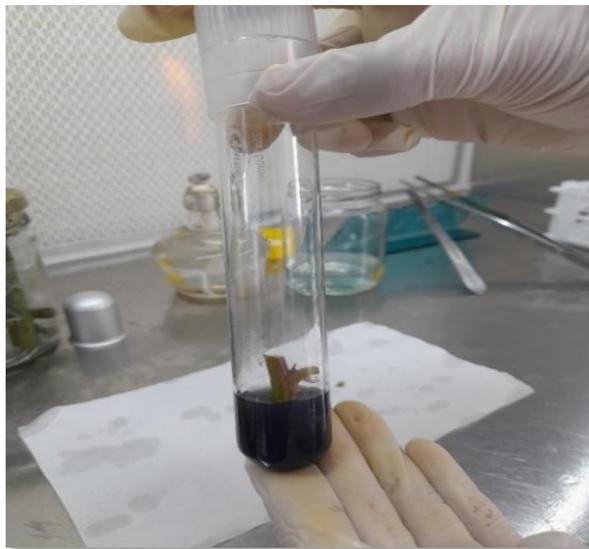
1. Corte de los segmentos nodales



2.Colocación del segmento nodal dentro del tubo de ensayo con la ayuda de una pinza previamente esterilizada.



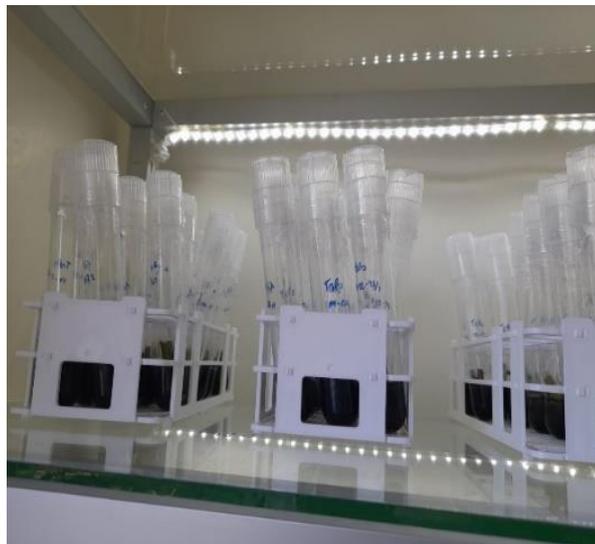
3.Segmento nodal colocado en el medio de cultivo



4. Etiquetado en cada tubo



5. Establecimiento de mora de castilla en tubos de ensayo dentro del cuarto de incubación



ANEXO D: ALTURA DE LOS BROTES



ANEXO E: MULTIPLICACIÓN

1. Extracción del explante brotado para su multiplicación.



2. Corte de las yemas



3. Colocación de la yema dentro del tubo de ensayo con medio de cultivo, con la ayuda de una pinza previamente esterilizada.





epoch

**Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje**

**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL**

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 22 / 06 / 2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Abigail de los Ángeles Bonilla Escobar
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Recursos Naturales
Carrera: Agronomía
Título a optar: Ingeniera Agrónoma
f. responsable: Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz


Ing. C. Castillo Ruiz



1107-DBRA-UTP-2023