ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción

"Regeneración de plantas completas de *Rubus glaucus* (Benth), mediante el uso de reguladores de crecimiento"

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

MAGISTER EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Presentada por:

Ivonne de los Ángeles Vaca Suquillo

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año 2012

AGRADECIMIENTO

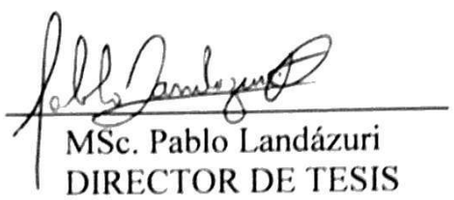
A mis padres, a mis amigos Pablo Landázuri, Gabriela Maridueña, Alejandro Patricio Núñez, Gerardo Valenzuela Martillo y su familia, a mis compañeros y amigos del centro de investigaciones IASA I, a mis maestros Dr. César Falconí, Ing. Jaime Villacís. Y a todos mis familiares y amigos.

DEDICATORIA

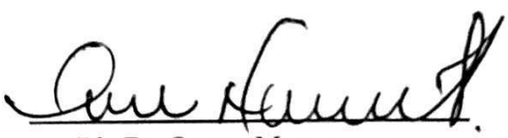
A Dios, a mis padres a quienes amo y respeto mucho, a mi familia y amigos. A todos ellos les dedico todos y cada uno de mis sueños alcanzados.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ph.D. Efrén Santos Ordóñez
DELEGADO DEL DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE



MSc. Pablo Landázuri
DIRECTOR DE TESIS



Ph.D. Oscar Navarrete
VOCAL PRINCIPAL

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL"

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).

Ing. Ivonne de los Ángeles Vaca Suquillo

RESUMEN

Se estudiaron las dosis de reguladores de crecimiento y concentraciones nitrógeno de las sales Murashige y Skooog (MS) en el medio, que afectan la multiplicación y enraizamiento de *Rubus glaucus.* Se encontró una mayor producción de brotes en la fase de multiplicación, con la adición de 2,25 ppm de BAP en el medio de cultivo. En la fase de enraizamiento la disminución de los nitratos a la mitad, por si solo fue un factor determinante en el incremento de plantas enraizadas. La adición de 3 ppm de Acido indol acético (AIA) en el medio o su ausencia, en interacción con la concentración de nitrógeno a la mitad, permitió obtener el mayor porcentaje de plantas enraizadas tanto *in vitro* como en adaptación a sustrato. La interacción 4,88 mM de nitrógeno en el medio junto con 3 ppm de AIA en enraizamiento, resultaron en los menores niveles de estrés de la planta, medidos en el índice del contenido de clorofila y actividad del fotosistema II o fluorescencia variable.

Palabras clave: *Rubus glaucus* (Benth), mora, cultivo *in vitro*, multiplicación enraizamiento, adaptación a sustrato, micropropagación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN……..……..... VI

ÍNDICE GENERAL……..… VII

ABREVIATURAS……..... X

ÍNDICE DE CUADROS…… XI

ÍNDICE DE GRÁFICOS……..... XIII

I. INTRODUCCIÓN 1

II. OBJETIVOS 3

2.1. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO 3

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS..... 3

III. REVISIÓN DE LITERATURA 4

3.1. *Rubus Glaucus* 4

3.1.1. Generalidades..... 4

3.1.2. Origen..... 5

3.2. CULTIVO DE TEJIDOS *in vitro*..... 7

3.2.1.Generalidades..... 7

3.2.1.1. Cultivo de meristemas y yemas axilares 8

3.2.2.Medios de cultivo y componentes 8

3.2.2.1.Sales inorgánicas 9

3.2.2.1.1.Fuentes de nitrógeno en el medio 10

3.2.2.2.Compuestos orgánicos 10

3.2.2.2.1.Carbohidratos o azúcares 10

3.2.2.2.2.Vitaminas y aminoácidos 11

3.2.2.3. Hexitoles 11

3.2.2.4. Reguladores de crecimiento 12

3.2.2.4.1.Auxinas 12

3.2.2.4.1.1.AIA 13

3.2.2.4.2.Citocininas 14

3.2.2.4.2.1.BAP o BA 15

3.2.2.5. Gelificantes 15

3.2.3. Etapas de la propagación *in vitro* 16

3.2.3.1. Etapa I 16

3.2.3.1.1. Selección del explante 16

3.2.3.1.2. Protocolo de desinfección 18

3.2.3.2. Etapa II 18

3.2.3.3. Etapa III 19

3.2.3.4. Etapa IV 19

3.2.4. Factores limitantes 20

3.2.4.1. Fenolización 20

3.2.4.2.Contaminación 21

IV. MATERIALES Y METODOS 22

4.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA. 22

4.2. METODOLOGÍA. 22

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 30

5.1.Determinación de la dosis adecuada de Benzil aminopurina (BAP), en la fase de multiplicación *in vitro*. 30

5.2.Determinación de la dosis adecuada de Acido indol acético (AIA) y la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo, en la fase de enraizamiento *in vitro* y adaptación a sustrato..... 32

5.3.Determinar el tratamiento más económico para la obtención de plantas completas de *Rubus glaucus* adaptadas a sustrato. 48

VI. CONCLUSIONES 53

VII. RECOMENDACIONES 54

X. ANEXOS..... 555

XI. BIBLIOGRAFÍA. 700

ABREVIATURAS

AIA	Ácido indol acético
2,4-D	Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético
BAP	Benzil amino purina
ºC	Centígrados.
cm	Centímetro.
mm	Milímetro.
g	Gramo.
mg	Miligramo
ha	Hectárea.
kg	Kilogramo.
L	Litro.
mL	Mililitro
µL	Microlitro
meq	Miliequivalentes
ppm	Partes por millón.
h	Hora.
min	Minuto.
s	Segundo
m^2	Metro cuadrado
mM	Milimolar
µM	Micromolar

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 5.2.1. Promedio (±) el error estándar del número de raíces y longitud de la raíz *in vitro,* para la concentración de nitrógeno en el medio de enraizamiento. 32

Cuadro 5.2.2. Promedio (±) el error estándar del número de raíces y longitud de la raíz *in vitro,* para las dosis de auxina utilizadas en el medio. 34

Cuadro 5.2.3. Promedio (±) el error estándar del número de raíces y longitud de la raíz *in vitro,* para los tratamientos..... 35

Cuadro 5.2.4. Promedio (±) el error estándar del porcentaje de plantas enraizadas *in vitro* y en sustrato, para la concentración de nitrógeno en el medio. 38

Cuadro 5.2.5. Promedio (±) el error estándar del porcentaje de plantas enraizadas *in vitro* y en sustrato, para la dosis de AIA en el medio 39

Cuadro 5.2.6. Promedio (±) el error estándar del porcentaje de plantas enraizadas *in vitro* y en sustrato, para los tratamientos..... 41

Cuadro 5.3.1. Costos fijos de producción por fase. 48

Cuadro 5.3.2. Costos variables de producción en la fase de multiplicación *in vitro* de mora. 49

Cuadro 5.3.3. Costos por explante de mora, en la fase de multiplicación *in vitro* de todos los tratamientos. 49

Cuadro 5.3.4. Costos variables de producción de las concentraciones de nitrógeno y AIA en el medio, en la fase de enraizamiento *in vitro* de mora. 50

Cuadro 5.3.5. Costos variables de producción en la fase de enraizamiento *in vitro* de mora. 51

Cuadro 5.3.6. Costo total por explante, de una planta de mora enraizada *in vitro* y adaptada a sustrato de todos los tratamientos. 52

LISTADO DE GRÁFICOS

Figura 5.1.1. Brotes obtenidos al final de la fase de multiplicación en cada tratamiento……31

Figura 5.2.1. Enraizamiento *in vitro* de mora……..37

Figura 5.2.2. Plantas de mora enraizadas *in vitro* adaptadas a sustrato……41

Gráfico 5.2.1. Regresión lineal entre porcentaje de plantas enraizadas e Indice del contenido de clorofila en sustrato, para las tres concentarciones de nitrógeno……..45

Gráfico 5.2.2. Regresión lineal entre porcentaje de plantas enraizadas *in vitro* y la actividad del fotosistema II *in vitro*, para las concentarciones de los tratamientos…..47

Figura A2.1. Longitud de onda absorbida en la fotosíntesis……..58

Figura A2.2. Estructura del cloroplasto…….59

Figura A2.3. Molécula de la clorofila……..61

Figura A2.4. Complejos tilacoidales y las reacciones lumínicas durante la fotosíntesis…….64

Figura A2. 5. Test de adaptación a la oscuridad……...67

Figura A3.1. Absorvancia de la clorofila……71

I. INTRODUCCIÓN

Rubus glaucus, denominada comúnmente como mora de castilla, es una especie nativa de Los Andes, de uso comestible. Esta es la variedad que más se cultiva en el Ecuador, debido a su gran demanda tanto en el mercado interno como externo (Marulanda *et al.* 2000 y PROFIAGRO, 2007). Ecuador, en el año 2008 obtuvo un crecimiento significativo en la exportación de mora, alcanzando 22 mil USD que representan cerca de 12 toneladas de mora, con un crecimiento equivalente al 241.25% respecto al 2007. Estados Unidos es el primer socio comercial ecuatoriano, captando el 56% de las exportaciones totales de mora, seguido por España con el 20% (CICO, 2009).

La mora es cultivada comercialmente en diferentes países de América, como: Colombia, Ecuador, Chile, Panamá, Guatemala, México y Canadá (Ledin, 1955; CAQ, 1992 y PROFIAGRO, 2007). Actualmente en nuestro país, se cultiva en los Valles del Callejón interandino y en las estribaciones de la Sierra, su cultivo alcanza las 5247 hectáreas, su mayor parte está en manos de pequeños y medianos productores, que tienen entre 200 hasta 2000 plantas en producción (PROFIAGRO, 2007; DICYT, 2008).

Para el cultivo de mora de castilla, los sistemas de reproducción, son tanto sexual como asexual. Se usa principalmente el sistema asexual, debido a la baja cantidad de

semillas fértiles en cada fruto, bajo poder germinativo, largo período de germinación y lento desarrollo de las plántulas (CAQ, 1992 y FNCC, 1994). Sin embargo, en la propagación asexual los problemas esenciales son: la diseminación de enfermedades internas de la planta madre y la pérdida de variabilidad genética (Rasiman y Gonzáles, 2008©). Además, la forma de propagación asexual es la causa de la variación en el rendimiento por hectárea, ya que mediante este método no se obtienen plantas homogéneas y sanas, obteniendo rendimientos que varían entre 0,94 $tm.ha^{-1}$ en Imbabura y 2,87 $tm.ha^{-1}$ en Tungurahua (CAQ, 1992).

Debido a la falta de plantas certificadas en el país, se hace necesario buscar alternativas que permitan propagar plantas de mora libres de patógenos. Lo que ha llevado a considerar al uso de cultivos *in vitro* como una herramienta para obtener plantas de calidad (INIAP, 1998). En el Ecuador se han hecho algunos intentos de micropropagación, reportando considerables avances en esta técnica, pero no se han obtenido los resultados deseados (INIAP, 2008).

Si bien es cierto, los diversos métodos de propagación para el cultivo de mora de castilla, presentan tanto ventajas como desventajas, el presente proyecto plantea establecer un método de propagación *in vitro* del cultivo, que permita al propagador la producción de plantas sanas a gran escala. Esto permitirá optimizar la producción e incrementar las utilidades tanto del propagador como del productor.

II. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

Establecer un protocolo de regeneración de plantas completas de *Rubus glaucus* (Benth), mediante el uso de reguladores de crecimiento.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar la dosis adecuada de Benzil aminopurina (BAP), mediante la evaluación de cuatro dosis de citocinina en la fase de multiplicación *in vitro*, que permita obtener el mayor número de brotes.

Determinar la dosis adecuada de auxina, mediante la evaluación de tres dosis de Acido indol acético (AIA); y la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo mediante tres niveles, en la fase de enraizamiento, que permita obtener el mayor número de plantas enraizadas *in vitro* y adaptadas a sustrato.

Determinar el tratamiento más económico para la obtención de plantas completas de *Rubus glaucus* adaptadas a sustrato.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1.*Rubus Glaucus*

3.1.1. Generalidades

Rubus glaucus conocida comúnmente como Mora de castilla, tiene diversos usos ancestrales por sus propiedades nutricionales y medicinales. El fruto de la mora se puede consumir en fresco, entera, en jugo o industrializada; la agroindustria ofrece diversas opciones como: pulpas, mermeladas, jaleas, refrescos, vinos y lácteos. El contenido nutricional de la mora, fruto rico en vitaminas y minerales, tiene gran aceptación en el mercado internacional (Marulanda *et al.* 2000; Bonilla y Gallegos, 2001 y Alvarado, 2002). Actualmente los principales mercados para este fruto, Europa y Estados Unidos, han incrementado el consumo de frutas y verduras, teniendo muy en cuenta el factor nutricional en su dieta (PROFIAGRO, 2007).

Para cubrir tanto demanda nacional como internacional y aumentar la oferta, en el país se ha incrementado el área de cultivo notablemente desde el año 2000 y, en el año 2005 el Ecuador ya contaba con 2197 hectáreas cultivadas con mora, que representan el 16,8% del total de la superficie cultivada (PROFIAGRO, 2007).

En los últimos años el cultivo a gran escala ha estado limitado, por la dificultad en la obtención de material para la siembra de buena calidad genética y sanitaria, así como en la cantidad para iniciar una nueva plantación, la propagación actualmente se la realiza vía asexual pricipalmente (Marulanda *et al.* 2000).

3.1.2. Origen

La mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth) es una planta de origen silvestre, fue encontrada por el investigador Popenoe, creciendo en estados silvestres individualmente o formando grupos con otras variedades (Ledin, 1955 y CAQ, 1992). Se encuentran diseminadas en casi todo el mundo excepto en las zonas desérticas. *Rubus glaucus* es originaria de las zonas altas tropicales de América principalmente en Colombia, Ecuador, Panamá, Guatemala, Honduras, México y Salvador. (Ledin, 1955; Alvarado, 2002 y PROFIAGRO, 2007).

3.1.3. Propagación

La mora de castillas se propaga tanto de forma asexual como sexual. Sin embargo actualmente su propagación es principalmente asexual, dentro de la cual existen los siguientes tipos de propagación (Marulanda *et al.* 2000, Castro y Cerdas, 2005):

3.1.3.1. Por estacas

La propagación por estacas consiste en cortar secciones de tallo de 35 cm de longitud, con un diámetro aproximado de 1 cm y debe tener entre 3 a 4 yemas. La estaca es directamente plantada en una funda con sustrato, utilizando hormonas para enraizamiento. Se obtendrá la planta lista para trasplante en 60 días aproximadamente (Franco y Giraldo, 1999 y Arellano y Mantilla, 2007).

3.1.3.2. Acodo de punta o terminal

Esta forma de multiplicación consiste en enterrar las puntas de los tallos de por lo menos 1,5m de longitud, sin desprenderlas de la planta madre, en una maceta con un sustrato rico en materia orgánica. A los 60 días se corta el tallo y la planta está lista para ser trasplantada (Franco y Giraldo, 1999 y Castro y Cerdas, 2005).

3.1.3.3. Acodo rastrero y terminal

En este método se obtienen la mayor cantidad de plántulas. Se seleccionan ejes primarios que tengan cerca de 2m de longitud, el tallo se agobia hasta colocarlo horizontalmente al ras del suelo, colocándoles hasta tres porciones de tierra sobre el tallo, además se entierran todos los ápices del tallo, tanto el principal como los secundarios. Aproximadamente a los 60 días se separan las plántulas y se trasplantan (Franco y Giraldo, 1999 y Castro y Cerdas, 2005).

3.1.3.4. Propagación por raíz o fragmentos de tallo subterráneo

Para realizar este tipo de propagación se deben obtener fragmentos de tallo subterráneo, de plantas seleccionadas, los mismos que serán divididos en secciones de 10 a 15 cm de longitud, 1 a 1,5 cm de diámetro y con 2 a 3 yemas. Estas secciones se siembran en fundas con sustrato, en 45 a 60 días se obtendrán plantas listas para el trasplante (Castro y Cerdas, 2005).

3.1.3.5. Cultivo de tejidos

Con el fin de obtener una propagación de forma rápida, a gran escala y de plantas sanas, libres de bacterias y hongos; la micropropagación y el cultivo de meristemas, son excelentes opciones para la multiplicación del cultivo de mora de castilla (Marulanda *et al.,* 2000; Castro y Cerdas, 2005 y Wu *et al.,* 2009)

Existen investigaciones sobre la propagación *in vitro* en *Rubus glaucus* en Colombia, como los trabajos realizados por Ramírez y Angarita (1990), Castro y Gaviria (1995), Ramírez *et al.* (1998) y Hernández *et al.* (1999), que no han sido enfocadas a la producción masiva de plantas y su adaptación a sustrato, ya que los protocolos desarrollados no han respondido como se esperaba (Marulanda *et al.,* 2000).

Según Marulanda *et al.* (2000) en la propagación *in vitro* de mora de castilla, recomienda el uso combinado de citocininas y giberelinas para una mayor tasa de multiplicación indicando que se puede reducir la concentración de la citocinina hasta 1ppm, sin embargo no llega a la fase de enraizamiento y adaptación a sustrato.

3.2.CULTIVO DE TEJIDOS *in vitro*

3.2.1. Generalidades

El cultivo *in vitro* se basa en la "totipotencia celular", esto es la capacidad de las células para regenerarse en una planta completa. Este tipo de propagación se realiza en estrictas condiciones de asepsia, con medios de cultivo nutritivos y condiciones

artificiales controladas, simulando el medio de la planta madre (Jordan y Goreaux, 1990; Reyes y Hewstone, 1994 citados por Toro, 2004).

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

3.2.1.1. Cultivo de meristemas y yemas axilares

Se inició en los años 60, con el cultivo aséptico de los brotes y meristemas de la orquídea *Cymbidium* sp., que cortados y sembrados correctamente *in vitro,* poseían la capacidad de producir protocormos que originaron en una plántula. Desde entonces, en diversos cultivos, se utiliza éste sistema de propagación a partir de una punta de brote y meristemas, para obtener plantas completas o brotes múltiples. En cualquier caso, se espera la formación de ramas axilares, que puedan ser separadas y enraizadas, teniendo con este sistema una fuente permanente de yemas axilares capaces de producir una plántula, de forma rápida y en grandes cantidades (Krikorian, 1991b).

3.2.2. Medios de cultivo y componentes

El medio de cultivo es el sustrato donde se va a colocar al explante seleccionado, tienen diversos componentes generales y específicos que dependen del objetivo que se persiga en el cultivo. El medio de cultivo cumple con dos funciones principales:

proporciona soporte físico y todos los nutrientes necesarios para el desarrollo del explante (Cañizares, 1998; González, 2003; Toro, 2004).

La selección del medio es vital para el cultivo de tejidos, frecuentemente la modificación del mismo es necesaria para obtener diferentes tipos de respuestas en el crecimiento de un explante (Smith, 2000©). El cultivo de tejidos precisa de medios relativamente complejos, constituidos por sales inorgánicas y compuestos orgánicos como reguladores de crecimiento, vitaminas, un carbohidrato, hexitoles y un agente gelificante (Roca y Mroginski, 1991; Smith, 2000©).

3.2.2.1. Sales inorgánicas

El medio de cultivo debe cubrir las necesidades del explante, en forma general éste se encuentra compuesto principalmente por sustancias inorgánicas como: los macronutrientes que los conforman seis elementos mayores: nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y Azufre (S), y los micronutrientes que son necesarios para el crecimiento del explante, pues juegan un papel esencial en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas; entre estos se encuentran: hierro (Fe), manganeso (Mn), cobalto (Co), zinc (Zn), boro (B), cobre (Cu) y molibdeno (Mo) (Cañizares, 1998; González, 2003). La formulación de Murashige y Skoog (MS) (1962) es la más ampliamente usada, debido a su alto contenido de nitrato, potasio y amonio en comparación a otras formulaciones (Smith, 2000©).

3.2.2.1.1. Fuentes de nitrógeno en el medio

El nitrógeno forma parte de un grupo esencial de elementos, es el mineral que la planta requiere en mayores cantidades. El nitrógeno forma parte de los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, coenzimas, fosfolípidos y clorofilas, entre otras moléculas; y es uno de los principales factores que limitan el crecimiento de las plantas. Las fuentes de nitrógeno utilizadas por las plantas son el NH_4 y el NO_3, en el medio de cultivo el nitrógeno es suplementado en ambas formas, lo que permite que la planta crezca mejor, ya que la absorción y asimilación de las dos formas de nitrógeno promueve un balance anión-catión en la planta. Las plantas asimilian estos nutrientes mediante reacciones bioquímicas, que incluyen procesos de oxidación y reducción (Taiz y Zeiger, 2003©).

3.2.2.2. Compuestos orgánicos

3.2.2.2.1. Carbohidratos o azúcares

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

no son activas fotosintéticamente y requieren fuentes de carbohidratos. En el cultivo celular se utiliza comúnmente entre 2-5% de sacarosa o glucosa (Smith, 2000©).

3.2.2.2.2. Vitaminas y aminoácidos

Las vitaminas tienen funciones catalíticas en las reacciones enzimáticas, además favorecen el crecimiento del explante y su ausencia podría ser un factor limitante. Entre las vitaminas utilizadas para el cultivo *in vitro* están: tiamina, ácido nicotínico, piridoxina. (Krikorian, 1991a; Smith, 2000©; González, 2003). Se utilizan también el ácido cítrico y el ácido ascórbico, pero no como vitaminas sino como antioxidantes; una de las prácticas más comunes para contrarrestar el efecto de la oxidación fenólica, es agregar antioxidantes al medio de cultivo, los que son inhibidores de la polifenoloxidasa o absorbentes (González, 2003).

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

3.2.2.3. Hexitoles

El hexitol myo-inositol es importante en el cultivo de tejidos. Myo-inositol es un hexitol involucrado en la germinación de semillas, transporte de azúcar, nutrición mineral, metabolismo de los carbohidratos, estructura de la membrana, formación de

la pared celular, homeostasis hormonal y estrés fisiológico. Se considera que el Myo-inositol favorece el crecimiento *in vitro* y puede ser fuente de carbohidratos, algunos consideran que actúa como vitamina (Smith, 2000©).

3.2.2.4. Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento están conformados por hormonas, que son compuestos orgánicos sintetizados por plantas superiores y otros de tipos sintético; ambos tienen una actividad semejante, distribuyen los compuestos que la planta biosintetiza y, determinan el crecimiento de los órganos de la planta en concentraciones muy por debajo de otros compuestos (Pierik, 1990). El tipo y concentración de reguladores de crecimiento varían según el propósito del cultivo (Smith, 2000©).

Los reguladores de crecimiento se han dividido en diversos grupos: auxinas, citocininas, giberelinas, otros (Pierik, 1990; Krikorian, 1991a).

3.2.2.4.1. Auxinas

La palabra auxina en griego significa crecer, se la utiliza para designar a las sustancias de elongación celular (Marassi, 2004©). En forma general las auxinas tiene la capacidad de promover el agrandamiento y alargamiento celular, además de la división celular (Krikorian, 1991a). En el cultivo de tejidos sus principales y mayores efectos son formación de raíces y brotes adventicios, embriogénesis,

formación y crecimiento de callos, inhibición del desarrollo de yemas axilares y del crecimiento de la raíz (González, 2003).

Las auxinas son compuestos naturales que poseen un núcleo indólico, sintetizadas a partir del aminoácido triptófano o a partir de la triptamina. Entre estas el Acido indol acético (AIA) es la sustancia de mayor uso, a pesar de contar con otros compuestos sintéticos que actúan como auxinas, entre estas las más comunes son el Acido indol butírico (AIB), el Acido naftalen acético (ANA) y el Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) (Krikorian, 1991a; González, 2003; Marassi, 2004©).

3.2.2.4.1.1.AIA

El Acido indol acético (AIA), fue la primera hormona en ser aislada e identificada en el año 1934, fue denominada auxina natural. Esta es sintetizada en los meristemos y en los tejidos en crecimiento, su movimiento es lento y basípeto (Gargia, 1991; Marassi, 2004©). El Acido indol acético (AIA) actúa al ligarse a un receptor de naturaleza proteica, forma un complejo receptor-hormona que es específico, reversible, saturable y de alta afinidad; éste activa un promotor que controla la expresión de los genes que codifican la síntesis de las enzimas catalizadores de los compuestos de la pared. Durante la elongación celular, el Acido indol acético (AIA) actúa momentáneamente sobre la bomba de protones ATPasa en la membrana plasmática, con un efecto secundario mediado por la síntesis de enzimas (Marassi, 2004©).

En forma natural sus principales acciones son inducción a partenocarpia en los frutos, incrementa la producción de etileno, incrementa la dominancia apical, favorece la elongación celular, retarda la abscisión, entre otras (Marassi, 2004©). El AIA es ampliamente utilizado en la formulación de medios, pero es sensible a la degradación enzimática y a la fotoxidación (Krikorian, 1991a; González, 2003)

A pesar de no poder establecer una concentración particular para su uso, el Acido indol acético (AIA) se utiliza en concentraciones entre 0,001 a 10 ppm, siendo la óptima alrededor de 0,1-1 ppm (Krikorian, 1991a).

3.2.2.4.2. Citocininas

El nombre citocininas fue adoptado en el año 1956, para designar a las sustancias de división celular (citocinesis) (Gargia, 1991; Krikorian, 1991a; Marassi, 2004©).

La citocininas son hormonas naturales derivadas de adeninas sustituidas, producidas en los órganos en crecimiento y en el tejido meristemático radicular. Su traslado es mínimo, se encuentran en el xilema (cuando son sintetizadas en la raíz) y en el floema; cuando se encuentra en las hojas están inmóviles (Marassi, 2004©). Existen también citocininas no purínicas como los son el thidiazuron (TDZ) y el CPPU (N-(2-cloro-4-piridil)-N-fenil urea), que tienen una actividad histoquímica muy fuerte (González, 2003).

Entre las principales citocininas se encuentran el BAP, IPA, Zeatina y Kinetina. Estas hormonas están involucradas en el metabolismo de los ácidos nucleicos, específicamente en la síntesis de ADN, de aquí su acción en la división celular y organogénesis; además promueven la germinación, la formación y crecimiento de callo, el desarrollo de yemas laterales, retardan la senescencia, inhiben el desarrollo de raíces adventicias, en presencia de auxinas promueven la división y elongación celular (Gargia, 1991; Marassi, 2004©).

3.2.2.4.2.1. BAP o BA

La N-6- benzil aminopurina (BAP) o N6-benciladenina (BA), es una hormona sintética aunque recientemente ha sido aislada de forma natural; actualmente es utilizada con mayor frecuencia que la Kinetina o la Zeatina, por su alta actividad y bajo costo (González, 2003; Marassi, 2004©).

3.2.2.5. Gelificantes

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

Generalmente se utiliza el agar en concentraciones de 0,6 a 0,8 %. Concentraciones menores a 0,4% y con un pH bajo no cuajan, mientras concentraciones muy altas, mayores a 1%, dificulta a los explantes establecer contacto con el medio (Pierik,

1990). Además, altas concentraciones de agar pueden afectar negativamente el crecimiento *in vitro* (Stolz, 1967 citado por Pierik, 1990).

3.2.3. Etapas de la propagación *in vitro*

Murashige (1974) citado en Krikorian (1991a), señala las etapas para la multiplicación de plantas mediante el cultivo de tejidos.

3.2.3.1. Etapa I

Es la etapa en la cual se establece el cultivo inicial**,** es una etapa crucial, se selecciona el explantes y se establece un pretratamiento de desinfección, puesto que los explantes obtenidos de plantas adultas pueden estar contaminados con hongos y/o bacterias. El medio utilizado en esta fase generalmente no contiene hormonas (Murashige, 1974 citado en Krikorian, 1991b).

3.2.3.1.1. Selección del explante

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

Genotipo: la capacidad para regenerarse y de división celular es muy variada dentro de una misma especie. Las dicotiledóneas tienen mayor capacidad de regeneración

que las monocotiledóneas. Una planta que se regenera fácilmente *in vivo*, se espera regenere de igual manera *in vitro*.

Edad de la planta: la capacidad de regeneración de un explante es inversamente proporcional a la edad del cultivo, es por ello que se tiende a utilizar material juvenil, embriones y semillas para regeneración *in vitro*.

Edad del órgano o tejido: se prefieren los tejidos jóvenes, no lignificados; a pesar de existir algunas excepciones. Independientemente de la edad, la capacidad regenerativa incrementa durante la floración.

Estado fisiológico: se ha demostrado que los explantes en estado vegetativo tienen mayor capacidad de regeneración *in vitro*, que los explantes en estado generativo. Las yemas en estado de reposo presentan mayor dificultad para regenerar *in vitro* (Pierik, 1990). El potencial organogénico del explante es inverso a su edad fisiológica (Roca y Mroginski, 1991b).

Estado sanitario: es importante seleccionar explantes sanos, pues esto repercute en el éxito del cultivo y en la contaminación del mismo.

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

Tamaño del explante: mientras mayor es el tamaño del explante es más fácil su regeneración, puesto que tienen sus propias reservas y hormonas (Pierik, 1990). Los explantes pequeños son más fáciles de desinfectar, pero su viabilidad tiende a ser baja además se dañan fácilmente (Roca y Mroginski, 1991b).

3.2.3.1.2. Protocolo de desinfección

El principal objetivo es evitar la contaminación en el cultivo de tejidos, para el éxito de éste. Este proceso debe permitir eliminar los microorganismos con el menor daño posible, mediante la desinfección superficial. No existe un protocolo general para la desinfección, pero para esto se debe tener en cuenta la especie y el tipo de explante (Roca y Mroginski, 1991b).

3.2.3.2. Etapa II

Esta es la fase de multiplicación simplemente o multiplicación de brotes y callos (Murashige, 1974 citado en Krikorian, 1991b). En esta etapa se emplean medios con reguladores de crecimiento: como las citocininas y auxinas (Krikorian, 1991b). La fase de elongación se ve incluida en esta etapa (elongación de brotes), es de gran importancia puesto que prepara a las yemas para el enraizamiento, su duración es de 10-15 días, su medio tiene alto contenido de citocininas (Ellena, 1998 citado por Toro, 2004).

3.2.3.3. Etapa III

Es la fase de enraizamiento o de pretransplante, es la fase en la que se pretende que la planta sea autotrófica, para que sea capaz de adaptarse al medio externo (Murashige, 1974 citado en Krikorian, 1991b). Para la fase de enraizamiento se requiere un medio adicionado con auxinas, Acido naftalen acético (ANA) y Ácido indol butírico (AIB) son más efectivos en rizogénesis que Acido indol acético (AIA), además requiere una fuente de carbohidratos, como lo es la sacarosa (Hartmann y Kester, 1997 citados por Henríquez, 2004).

3.2.3.4. Etapa IV

Es la etapa de adaptación de la vitroplanta al medio externo o la fase de transferencia final (Murashige, 1974 citado en Krikorian, 1991b). Esta fase es importante, ya que una planta regenerada *in vitro,* difiere en varios aspectos de una planta originada *in vivo,* por lo tanto su adaptación al medio externo es complicada. La vitroplanta debido a la alta humedad relativa (90-100%), posee una cutícula poco desarrollada y su sistema de cierre de estomas está atrofiado. Además no realizan un proceso de fotosíntesis normal, ya que su fuente de carbono está dispuesta en el medio, tienen hojas delgadas y con menor contenido de clorofila; por lo tanto es necesario activar paulatinamente su autotrofía para su adaptación al medio externo. El mecanismo de defensa de estas plantas no está activado, ya que se desarrollan en un medio estéril, por lo que resulta importante trabajar en condiciones asépticas, para obtener una alta tasa de sobrevivencia al cambiar las plantas *in vitro* al suelo (Pierik, 1990).

3.2.4. Factores limitantes

3.2.4.1. Fenolización

Durante el cultivo *in vitro*, algunas plantas al sufrir heridas producen exudados de color marrón o negro, como producto de la liberación y oxidación de polifenoles y taninos, que resultan en compuestos quinónicos que son tóxicos y, frecuentemente afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas, pudiendo ocasionar la muerte del explante (Pierik, 1990; Seeman y Barriga, 1993 citados por Toro, 2004).

La fenolización u oxidación, es el pardeamiento de los tejidos, más común en especies leñosas, se debe a diversos factores como: luz, especie, concentración de amonio en el medio, entre otros (Margara, 1986 y Seeman y Barriga, 1993 citados por Toro, 2004). Entre los controles de la oxidación, se encuentran los subcultivos y eliminación de tejidos senescentes de la base de los brotes (Angarita y Perea, 1991), la adicción al medio de carbono activado (0,2-0,3%), PVP (250-1000 ppm), antioxidantes (ácido cítrico, ácido ascórbico, tiourea o L-cistina), dietil-tiocarbamato ($2g.L^{-1}$) o aminoácidos (glutamina, arginina y asparagina); también es útil el uso de medios líquidos, el mantener los vástagos en la oscuridad, la reducción del tejido herido, el reducir la concentración de sales y el uso de reguladores, y lavar los explantes antes introducir (Pierik, 1990).

3.2.4.2. Contaminación

Existen cuatro fuentes de contaminación: el explante, el medio, el aire y el operador; la más importante es el material vegetal (Pierik, 1990).

La contaminación puede presentarse por un inadecuado protocolo de desinfección, cuando es una contaminación exógena y, al ser una contaminación endógena cuando se trata de contaminantes sistémicos (Seeman y Barriga, 1993 citados por Toro, 2004).

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1.UBICACIÓN GEOGRÁFICA.

El proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Control Biológico de la Carrera de Ciencias Agropecuarias – IASA I, de la Escuela Politécnica del Ejército ESPE, ubicada en Ecuador, Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Parroquia San Fernando, en la Hacienda "El Prado", a 78º24´44´´ (O) y 0º23´20´´ (S), a una altitud de 2748 m.s.n.m. Bajo condiciones controladas, en un cuarto de crecimiento con una temperatura entre 20-25º C y humedad relativa entre 43 y 60%.

4.2.METODOLOGÍA.

4.2.1. Determinación de la dosis adecuada de Benzil aminopurina (BAP), en la fase de multiplicación *in vitro*.

Las fases de micropropagación de la mora de castilla para ésta investigación fueron: introducción, multiplicación, enraizamiento y adaptación a sustrato, mismas que se desarrollaron en el medio Murashige y Skoog (1962) (Anexo 1).

La composición de éste medio estuvo dado por los macroelementos, microelementos y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con antioxidantes como: ácido cítrico, PVP y ácido ascórbico, además de sucrosa y agar.

Para la fase de introducción, el material vegetativo se obtuvo del invernadero de mora de castilla de la Carrera de Ciencias Agropecuarias, IASA I. Los explantes seleccionados fueron cultivados en el medio de introducción donde permanecieron 15 días; posteriormente los explantes fueron introducidos al medio de multiplicación.

4.2.1.1.Elección del explante

Las varetas fueron tomadas de la parte media alta de una misma planta de mora de castilla, éstas tuvieron una longitud promedio de 30 cm, cuyo número de yemas útiles varió entre 3 y 12.

4.2.1.2.Protocolo de desinfección

Todas las varetas seleccionadas fueron lavadas con jabón líquido durante 10 min, desinfectadas durante 15 min en yodo (10 gotas.L^{-1}), sumergidas en una solución con Benlate (1g.L^{-1}) durante 20 min y lavados en agua destilada estéril (ADE). En cámara de flujo laminar, los explantes fueron desinfectados en alcohol al 70% durante 10 segundos, Bioper (Acido peracético:peróxido de hidrógeno en relación 2:1) durante 1 min, hipoclorito de sodio al 2% del ingrediente activo durante 1 min y lavados en ADE. Finalmente, se introdujeron en medio MS modificado, sembrando un explante por tubo.

4.2.1.3.Fase de multiplicación

En esta fase se seleccionaron los brotes adaptados al medio de introducción, sin contaminación. Los explantes pasaron al medio de multiplicación MS modificado con adición de 0,75 ppm de Acido indol acético (AIA), en donde permanecieron durante 2 meses.

Durante la fase de multiplicación se evaluaron cuatro niveles de Benzil aminopurina (BAP) en el medio, obteniendo cuatro tratamientos (Cuadro 4.3.1.1).

Cuadro 4.3.1.1. Dosis de Benzil aminopurina (BAP) en el medio de multiplicación.

Citocinina		**Dosis ppm**	**Referencias**
T0	Testigo sin citocinina	0,0	Com. Per. Landázuri, 2009
T1	BAP (Benzil aminopurina)	0,75	Com. Per. Landázuri, 2009
T2	BAP (Benzil aminopurina)	1,50	Marulanda *et al.* 2000
T3	BAP (Benzil aminopurina)	2,25	Marulanda *et al.* 2000

La unidad experimental fue un contenedor de plástico autoclavable, con tapa (10,5 cm de diámetro y 7 cm de altura), con cuatro explantes de mora, provenientes de una misma planta madre. Cada unidad experimental contó como una repetición.

Los tratamientos se dispusieron bajo un diseño completamente al azar, con cuatro repeticiones.

El modelo matemático utilizado fue:

$$Y_i = u + B_i + \varepsilon_i$$

Donde:

$\mathbf{Y_i}$ = variable aleatoria

$\boldsymbol{u}$ = media general

$\mathbf{B_i}$ = efecto del i-ésima de la dosis de BAP

$\boldsymbol{\varepsilon_i}$ = error experimental

Durante la fase de multiplicación se colectaron datos de las siguientes variables:

Número de brotes formados: se contabilizó la cantidad de nuevos brotes formados, durante su permanencia en el medio. Longitud del explante: se midió la longitud de los explantes con papel milimetrado estéril, antes de su introducción al medio de multiplicación, y al finalizar la misma fase.

La actividad fotosistema II: se midió la actividad del fotosistema II mediante el uso de un Fluorómetro modelo OS-30p (Anexo 2), antes de la introducción al medio de multiplicación, y al finalizar la misma fase. Para las mediciones se tomó una hoja de cada explante de mora, se colocó la pinza con el paso de luz cerrado durante 5min, se abrió la ranura para permitir el paso de la luz e inmediatamente se colocó la pinza en el lector. El índice de clorofila (ICC): se midió el índice de contenido de clorofila, mediante un clorómetro modelo CCM200 (Anexo 3), antes de la introducción al medio de multiplicación, y al finalizar la misma fase, para la medición del contenido de clorofila se calibró el medidor de clorofila en la oscuridad durante 5 segundos y se colocó una hoja de mora en el lector.

4.2.2. Determinación de la dosis adecuada de Acido indol acético (AIA) y la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo, en la fase de enraizamiento que permita obtener el mayor número de plantas enraizadas *in vitro* y adaptadas a sustrato.

Los explantes de mora provenientes de la fase de multiplicación, fueron divididos y pasados al medio de enraizamiento, en donde permanecieron durante 35 días, hasta el aparecimiento de raíces.

En la fase de enraizamiento, se evaluó la concentración de nitrógeno total, proveniente de las sales inorgánicas adicionadas en el medio y las tres dosis de ácido indol acético (AIA) en el medio adicionada con benzil amino purina (BAP) en dosis fija (1ppm) (Cuadro 4.3.2.1), para la formación de raíces *in vitro.*

Los tratamientos de la fase de enraizamiento *in vitro* fueron pasados a sustrato, para su adaptación. Durante esta fase, las plantas fueron etiquetadas y evaluadas en función de los tratamientos *in vitro.* Las plantas fueron regadas con agua destilada estéril (ADE) dos veces por semana, durante los 28 días de evaluación.

Cuadro 4.3.2.1. Concentración total de Nitrógeno y tres dosis de Acido indol acético en el medio de enraizamiento *in vitro*.

Tratamiento		Concentración de N total (mM)	Dosis de AIA (ppm)	Referencia
T1	Medio MS 100% sin auxina	9,75	0,0	Pati *et al.* 2006.
T2	Medio MS 100%	9,75	1,5	
T3	Medio MS 100%	9,75	3,0	
T4	Medio MS 50% sin auxina	4,88	0,0	
T5	Medio MS 50%	4,88	1,5	
T6	Medio MS 50%	4,88	3,0	
T7	Medio MS 100% y KNO_3 25% sin auxina	7,48	0,0	
T8	Medio MS 100% y KNO_3 25%	7,48	1,5	
T9	Medio MS 100% y KNO_3 25%	7,48	3,0	

La unidad experimental para la fase de enraizamiento *in vitro* fue un contenedor plástico (12,5 cm de diámetro y 13 cm de longitud), con cuatro explantes de mora.

Los tratamientos para la fase de enraizamiento *in vitro* se dispusieron bajo un diseño completamente al azar en arreglo factorial 3x3, con tres repeticiones.

La unidad experimental para la fase de adaptación a sustrato fueron cuatro explantes de mora por tratamiento, en una bandeja forestal de 38 alveolos. La bandeja abarcó una repetición de cada uno de los tratamientos de enraizamiento *in vitro*.

Los tratamientos para la fase de adaptación a sustrato se dispusieron bajo un diseño completamente al azar en arreglo factorial 3x3, con tres repeticiones, es decir una bandeja por cda una de ellas.

El modelo matemático utilizado fue:

$$Y_{ij} = u + A_i + N_j + (AN)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Yij = variable aleatoria

u = media general

$\mathbf{A_i}$ = efecto del i-ésimo dosis de Acido indol acético (AIA)

$\mathbf{N_j}$ = efecto del j-ésima de la concentración de nitrógeno

$\mathbf{(AN)_{ij}}$ = Interacción Auxina - Concentración de nitrógeno

$\boldsymbol{\varepsilon_{ij}}$ = error experimental

Las variables evaluadas durante la fase de enraizamiento *in vitro*, fueron:

Número de raíces: se contabilizó la cantidad de raíces por explante formadas al final de esta fase. Longitud de la raíz: se midió la longitud de la raíz en centímetros (cm), desde el cuello (unión de la raíz y el tallo) hasta el extremo más largo, una sola vez a la salida de ésta fase. Porcentaje de plantas enraizadas *in vitro*: se contabilizó el número de individuos que enraizaron, en relación a la población total de tratamientos.

Las variables evaluadas durante la fase de adaptación a sustrato, fueron:

Porcentaje de plantas enraizadas en sustrato: se contabilizó el número de individuos que enraizaron, en relación a la población total de tratamientos.

Las variables evaluadas durante la fase de enraizamiento, tanto *in vitro* como en adaptación a sustrato, fueron:

Actividad fotosistema II: se midió la actividad del fotosistema II mediante el uso de un Fluorómetro modelo OS-30p (Anexo 2). Indice de clorofila: se midió el Índice de contenido de clorofila, mediante un clorómetro modelo CCM200 (Anexo 3). El procedimiento de medición para ambas variables fue igual que en la fase de multiplicación.

4.2.3. Determinar el tratamiento más económico para la obtención de plantas completas de *Rubus glaucus* adaptadas a sustrato.

Para la definición de costos en cada tratamiento, se siguió la metodología del presupuesto parcial según Perrin *et al.* (1976), considerando los costos variables de cada tratamiento, así como los costos en cada una de las fases de introducción, de multiplicación y de enraizamiento.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1.Determinación de la dosis adecuada de Benzil aminopurina (BAP), en la fase de multiplicación *in vitro*.

Se realizó un análisis de los valores obtenidos para el número de brotes formados y la longitud de brote en relación a los cuatro tratamientos (cuatro dosis de BAP). El cuadro 5.1.1 se presenta el número de brotes formados por explante y la longitud del brote para las cuatro dosis de BAP (tratamientos).

Cuadro 5.1.1. Promedio (±) el error estándar del, número de brotes formados y longitud del brote, de los explantes de mora de castilla introducidos al medio de multiplicación, para los tratamientos.

Tratamientos	[BAP] (ppm)	Número de brotes formados	Longitud brote
0	**0,00**	2,14 ± 0,33 a	1,68 ± 0,66
1	**0,75**	3,07 ± 0,46 ab	1,96 ± 0,25
2	**1,50**	3,67 ± 0,45 b	1,53 ± 0,31
3	**2,25**	5,27 ± 0,66 c	2,18 ± 0,37

Para la variable número de brotes se determinó que existió diferencia significativa para tratamientos (F=7,76, p=0,0002) con un coeficiente de variación de 5,6. La dosis de BAP de 2,25 ppm (T3) presentó el mayor número de brotes formados con un promedio de 5,27 brotes por explante (Cuadro 5.1.1, Figura 5.1.1). Muñoz y Reyes (2006) indican que su mayor producción en número promedio de brotes de mora, fue de 3,13 brotes con la adición de 2,5 ppm de BAP en el medio de cultivo.

Además, Marulanda *et al.* (2000) obtiene el mayor incremento de la tasa de multiplicación, con la adición de 2 ppm de BAP en el medio de cultivo, resultados idénticos a los obtenidos por Ramírez y Angarita (1990), García (2004), Asadi *et al*. (2009), Saleck y Tarinejad (2011) en sus ensayos.

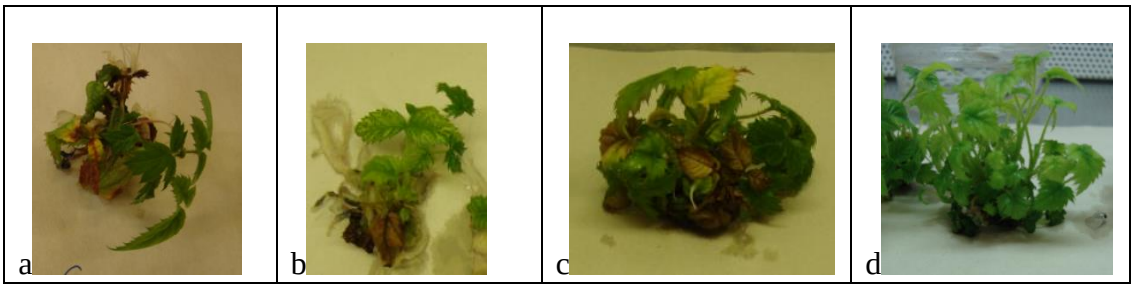


Figura 5.1.1. Brotes obtenidos al final de la fase de multiplicación en cada tratamiento a) T0: sin auxinas, b) T1: BAP 0,75 ppm, c) T2: BAP 1,5 ppm y d) T3: BAP 2,25ppm.

Para la variable longitud del brote se determinó que no existió diferencia significativa para tratamientos, lo que coincide con Marulanda *et al.* (2000) que reportan que el aumento en la concentración de la citocinina BAP no incrementa significativamente la altura media de las yemas. Sin embargo se puede destacar que la dosis 2,25 ppm de BAP (T3) presentó la mayor longitud del brote con un promedio de 2,18 cm (Cuadro 5.1.1).

Para las variables índice de clorofila y actividad del fotosistema II se determinó que no existió diferencia significativa para tratamientos en la fase de multiplicación (Cuadro 5.1.2).

Cuadro 5.1.2. Promedio (±) el error estándar del índice de clorofila (ICC) y actividad del fotosistema II (FSII) de los explantes de mora de castilla en el medio de multiplicación.

Tratamiento	[BAP] (ppm)	ICC (%)	Actividad FSII
0	**0,00**	5,85 ± 1,5	0,73 ± 0,02
1	**0,75**	7,64 ± 0,9	0,72 ± 0,03
2	**1,50**	6,98 ± 1,1	0,65 ± 0,05
3	**2,25**	8,64 ± 1,8	0,64 ± 0,04

5.2.Determinación de la dosis adecuada de Acido indol acético (AIA) y la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo, en la fase de enraizamiento *in vitro* y adaptación a sustrato

En el cuadro 5.2.1 se presenta el número de raíces formadas por explante y la longitud de la raíz en cm para los tres niveles de nitrógeno en el medio de cultivo.

Cuadro 5.2.1. Promedio (±) el error estándar del número de raíces y longitud de la raíz *in vitro*, para la concentración de nitrógeno en el medio de enraizamiento.

[N] mM	Número de raíces	Longitud de la raíz (cm)
9,75	0,74 ± 0,28 a	0,52 ± 0,17 a
7,48	3,03 ± 0,67 b	1,68 ± 0,29 b
4,88	3,72 ± 0,58 b	1,80 ± 0,25 b

Tanto la variable número de raíces como longitud de la raíz presentan diferencias significativas para la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo (F=9,75, p=0,0001; F=9,99, p=0,0001), con un coeficiente de variación 12,66 y 10,87

respectivamente. La concentración de 4,88 mM de nitrógeno, es decir nitratos reducidos a la mitad en el medio, presentaron el mayor número de raíces con 3,72 raíces por explante y mayor longitud de raíz, con un promedio 1,8 cm (Cuadro 5.2.1). Alev y Arslan (2006) indican haber obtenido el mayor número de raíces en rosas, con un promedio de 5,6 raíces, cultivando en medio MS formulado a la mitad de la concentración de macro, microsales y vitaminas; mientras que los cultivos en medio MS completo y diluido ¼ de la concentración, obtuvieron promedios de longitud de raíz bajos, con valores de 1,91 y 0,67 respectivamente.

Hydman *et al.* (1982a) lograron obtener un mayor número y longitud de raíces *in vitro*, de *R. hybrida* cv. "Improved Blaze" al disminuir la concentración total de nitrógeno de las sales MS en el medio, manteniendo la concentración de las otras sales constante. Además, reportan que al evaluar independientemente las concentraciones de nitrato (NO_3) y amonio (NH_4), ninguno de los tratamientos tiene el mismo efecto de enraizamiento, que cuando se disminuyen juntos, manteniendo la misma relación NO_3/NH_4. Resultados que coinciden con los obtenidos en el presente estudio, ya que la concentración 4,88 mM de nitrógeno (1/2 de sales), que mantiene la misma relación NO_3/NH_4 que MS completo, produjo el mayor número y longitud de raíces. Ma *et al.* (1996) y Wu *et al.* (2009) también reportan resultados que concuerdan con los obtenidos en el presente estudio en la fase de enraizamiento.

Para las variables número de raíces y longitud de la raíz, se determinó que no existió diferencia significativa para las dosis de auxina (AIA) en la fase de enraizamiento (Cuadro 5.2.2).

Cuadro 5.2.2. Promedio (±) el error estándar del número de raíces y longitud de la raíz *in vitro,* para las dosis de auxina utilizadas en el medio.

[AIA] ppm	**Número de raíces**	**Longitud de la raíz (cm)**
0	2,33 ± 0,45	1,53 ± 0,29
1,5	3,00 ± 0,69	1,33 ± 0,24
3	2,17 ± 0,56	1,14 ± 0,25

Para la variable número de raíces en la fase *in vitro* se determinó que existió diferencia significativa para tratamientos (F=6,62, p=<0,0001) con un coeficiente de variación de 11,09. El T6 consistió en la interacción de nitrógeno en el medio (4,88 mM) y AIA (3 ppm), presentó el mayor número de raíces formadas por explante en esta fase con un promedio de 5,08 (Cuadro 5.2.3). Azadi *et al.* (2007) reportan haber obtenido el mayor número de raíces en rosa, con la reducción de sales MS y la adición de 6 ppm de AIA en el medio de cultivo. Resultados que concuerdan con Muñoz y Reyes (2006), que indican una mayor producción de raíces por planta con su dosis más alta de auxina, 2 ppm de AIA en el medio.

Cuadro 5.2.3. Promedio (±) el error estándar del número de raíces y longitud de la raíz *in vitro*, para los tratamientos

Trat	[N] mM	[AIA] ppm	Número de raíces	Longitud de la raíz (cm)
1	**9,75**	**0**	0,48 ± 0,35 ab	0,37 ± 0,25 ab
2	**9,75**	**1,5**	1,58 ± 0,72 abc	1,02 ± 0,40 abc
3	**9,75**	**3**	0,17 ± 0,17 a	0,18 ± 0,18 a
4	**4,88**	**0**	3,25 ± 0,82 bcd	2,14 ± 0,57 c
5	**4,88**	**1,5**	2,83 ± 0,84 abcd	1,23 ± 0,34 abc
6	**4,88**	**3**	5,08 ± 1,25 d	2,03 ± 0,38 c
7	**7,48**	**0**	3,25 ± 0,82 abcd	2,08 ± 0,47 c
8	**7,48**	**1,5**	4,58 ± 1,70 cd	1,74 ± 0,51 bc
9	**7,48**	**3**	1,25 ± 0,49 ab	1,21 ± 0,51 abc

La variable longitud de las raíces en la fase *in vitro* presentó diferencia significativa para tratamientos (F=3,04, p=0,0043) con un coeficiente de variación de 10,87. Los tratamientos T4: N 4,88 mM sin auxina; T6: N 4,88 mM + AIA 3 ppm y T7: N 7,48 mM sin auxina, presentaron la mayor longitud de raíces en esta fase, con 2,14; 2,03 y 2,08 cm de longitud, respectivamente (Cuadro 5.2.3, Figura 5.2.1). Hyndman *et al.* (1982b) citado por Azadi *et al.* (2007) indica que la interacción entre la concentración de las sales y el AIA en el medio, tuvieron un efecto significativo en la longitud de la raíz, del mismo modo Azadi *et al.* (2007) indican haber obtenido la mayor longitud de raíces en rosa (12,95 mm), en medio MS reducido las sales a un cuarto y en ausencia de AIA. Cabe señalar que el T6, que contiene la mitad de concentración de nitrógeno del medio MS (4,88 mM) y 3 ppm de AIA, presentó tanto el mayor número de raíces como mayor longitud de raíz.

Para la variable porcentaje de plantas enraizadas en la fase *in vitro* se determinó que existió diferencia significativa para concentraciones de nitrógeno en el medio (F=16,67, p=<0,0001) con un coeficiente de variación de 8,08. Las concentraciones de 7,48 y 4,88 mM de nitrógeno en el medio, presentaron un porcentuaje de enraizamiento de 61 y 78% respectivamente (Cuadro 5.2.4).

La dilución de las sales en el medio de cultivo, puede influenciar positivamente en el enraizamiento de las plantas, Alev y Arslan (2006) obtuvieron la mayor frecuencia de enraizamiento, con un 50% de explantes de rosa enraizados, en un medio que contenía la mitad de las sales de MS. Además, según Ramírez y Angarita (1990) se obtuvó un 100% de enraizamiento *in vitro* de plantas de mora, con los macroelementos diluidos a la quinta parte, por lo que recomienda la dilución de los macroelementos en el medio de cultivo para mejorar los porcentajes de supervivencia y enraizamiento. Estos resultados se relacionan con los obtenidos por Wu *et al.* (2009) que indican que una reducción de sales de un medio a un quinto, mejoran el enraizamiento de algunas especies del género *Rubus* hasta llegar a un 85% de plantas enraizadas.

Luna *et al.* (2004), recomienda el medio MS diluido 4 veces, para el enraizamiento *in vitro* de *Ilex dumosa.* Hydman *et al.* (1982a) demostró que la disminución de la concentración de KNO_3 y NH_4NO_3 fue un factor decisivo para el mejoramiento en el

porcentaje de enraizamiento en rosa, lo que concuerda con Asadi *et al*. (2009) y Salek y Tarinejad (2011).

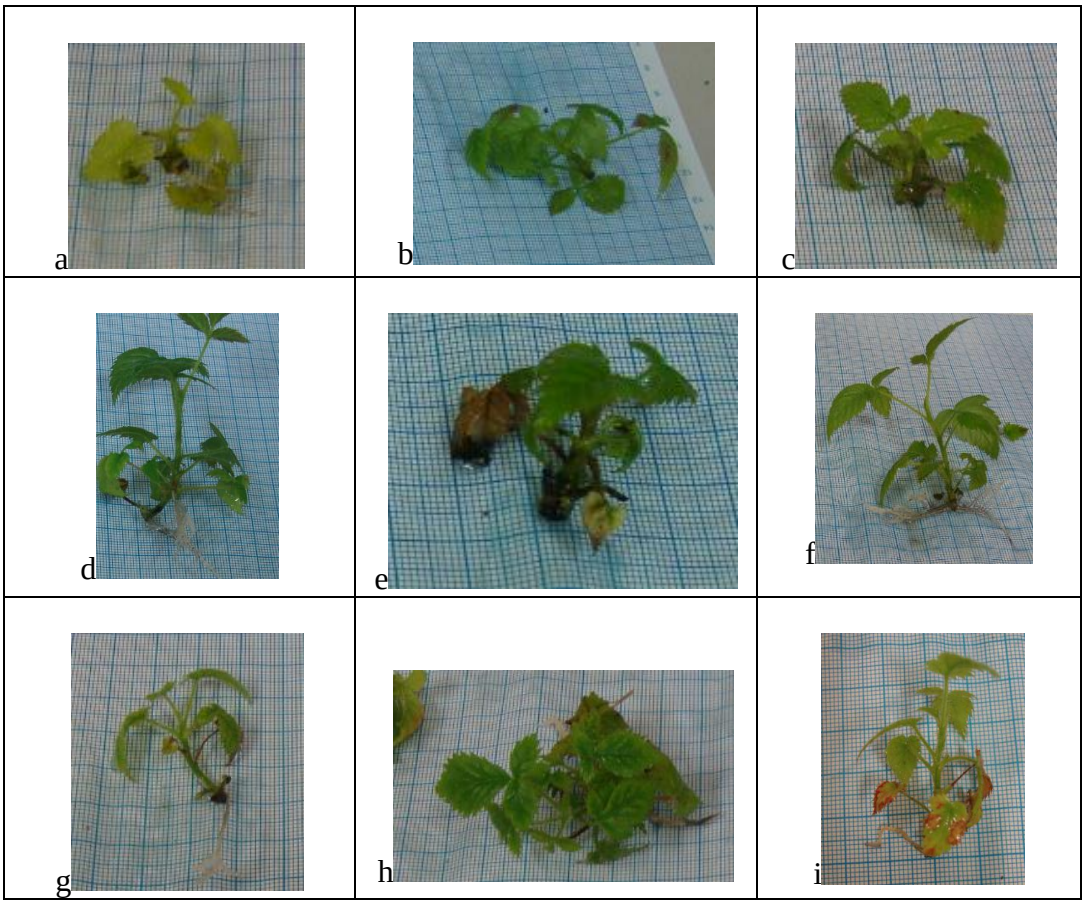


Figura 5.2.1. Enraizamiento *in vitro* de mora a) T1:N9,75mM sin auxina, b) T2: N 9,75mM+AIA 1,5ppm, c) T3: N9,75mM+AIA 3 ppm, d) T4: N 4,88mM sin auxina, e) T5:N 4,88mM+AIA 1,5ppm, f) T6:N 4,88+AIA 3ppm, g) T7: N 7,48mM sin auxina, h) T8: N 7,48mM + AIA1,5 ppm, i) T9: N 7,48mM + AIA 3 ppm.

Cuadro 5.2.4. Promedio (±) el error estándar del porcentaje de plantas enraizadas *in vitro* y en sustrato, para la concentración de nitrógeno en el medio.

[N] mM	**% plantas enraizadas *in vitro***	**% plantas enraizadas en sustrato**
9,75	22 ± 7 a	85 ± 6 a
7,48	61 ± 8 b	95 ± 5 ab
4,88	78 ± 7 b	100 ± 0 b

Para la variable porcentaje de plantas enraizadas en la fase de adaptación a sustrato, se determinó que existió diferencia significativa para concentraciones de nitrógeno en el medio (F=4,27, p=0,0169) con un coeficiente de variación de 17,92. La concentración 4,88 mM de nitrógeno en el medio, presentó 100% de plantas enraizadas en la fase de sustrato (Cuadro 5.2.4), lo que coincide con los resultados obtenidos por Ramírez y Angarita (1990), quienes obtuvieron un 100% de plantas de mora enraizadas con MS diluido. Wu *et al.* (2009) reporta una supervivencia del 98% en la fase de adaptación a sustrato, de explantes de rosa *in vitro* provenientes de medios de cultivo con sales diluidas.

Para la variable porcentaje de plantas enraizadas en la fase *in vitro* se determinó que no existió diferencia significativa para las dosis de AIA en el medio (F=2,49, p=0,0879). La dosis 1,5 ppm presentó el mayor porcentaje de enraizamiento en esta fase, con 63% de plantas enraizadas (Cuadro 5.2.5).

Para la variable porcentaje de plantas enraizadas en la fase de adaptación a sustrato, se determinó que no existó diferencia significativa para dosis de AIA en el medio, el porcentaje de plantas enraizadas para todos los niveles evaludos fue superior al 90%, (Cuadro 5.2.5). Según Pati *et al.* (2005), el porcentaje de enraizamiento en la fase *ex vitro* normalmente es superior a la fase *in vitro*, esto se debe a que siempre el enraizamiento *ex vitro* produce mayor número de raíces con mayor longitud e incrementa el área de enraizamiento, lo que concuerda con los resultados obtenidos del presente estudio, en donde el porcentaje de plantas enraizadas en sustrato es mayor al porcentaje de plantas enraizaizadas en la fase *in vitro*.

Cuadro 5.2.5. Promedio (±) el error estándar del porcentaje de plantas enraizadas *in vitro* y en sustrato, para la dosis de AIA en el medio

[AIA] ppm	**% plantas enraizadas *in vitro***	**% plantas enraizadas en sustrato**
0	58 ± 8	94 ± 4
1,5	63 ± 9	91 ± 5
3	43 ± 8 <	92 ± 5

Para la variable porcentaje de plantas enraizadas en la fase *in vitro* se determinó que existió diferencia significativa para tratamientos (F=4,44, p=0,0001) con un coeficiente de variación de 8,08. T4 (N 4,88 mM, sin auxina) y T6 (N 4,88 mM y AIA 3 ppm), presentaron el mayor valor porcentual de enraizamiento en esta fase, con 83% de plantas enraizadas (Cuadro 5.2.6). Hyndman *et al.* (1982b) citado por Azadi *et al.* (2007) indican que la dilución de sales y las dosis de AIA en el medio,

tuvieron un efecto significativo en el enraizamiento. Kirichenko *et al.* (1991) citado por Pati *et al.* (2005) reportan un enraizamiento óptimo en la *R. hybrida* cv. Champlain que fue logrado con altas concentraciones de AIA y bajas concentraciones de sales en el medio. Skirvin y Chu (1979) citados por Pati *et al.* (2005) indujeron el enraizamiento de microbrotes de rosa, en medio semisólido libre de reguladores de crecimiento; del mismo modo Raymundo *et al.* (2005), reporta enraizamiento de agave en medio MS con sales a la mitad y ausencia de hormonas.

Para la variable porcentaje de plantas enraizadas en la fase de adaptación a sustrato, se determinó que no existió diferencia significativa para tratamientos (F=1,50, p=0,1685). Cabe mencionar que los tratamientos que presentaron el mayor porcentaje de enraizamiento fueron T4 (N 4,88 mM, sin auxina), T5 (N 4,88 mM y AIA 1,5 ppm), T6 (N 4,88 mM y AIA 3 ppm) y T8 (N 7,48 mM y AIA 1,5 ppm) con 100% de plantas enraizadas en la fase de adaptación a sustrato (Cuadro 5.2.6). Se observó también, que el porcentaje de enraizamiento de las plantas de mora en sustrato fue mayor al porcentaje de enraizamiento *in vitro*; lo que concuerda con Rogers y Smith (1992), que indican que el enraizamiento *ex vitro* produjó mayor longitud y número de raíces, incrementando también el área y porcentaje de enraizamiento, conjuntamente indican que las raíces en *ex vitro*, fueron flexibles, ramificadas y formaron pelos radiculares, contrario a las características de las raíces obtenidas durante la fase *in vitro.*

Cuadro 5.2.6. Promedio (±) el error estándar del porcentaje de plantas enraizadas *in vitro* y en sustrato, para los tratamientos.

Trat	[N] mM	[AIA] ppm	% plantas enraizadas *in vitro*	% plantas enraizadas en sustrato
1	**9,75**	**0**	17 ± 11 ab	91 ± 9
2	**9,75**	**1,5**	42 ± 15 abc	73 ± 14
3	**9,75**	**3**	8 ± 8 a	92 ± 8
4	**4,88**	**0**	83 ± 11 c	100 ± 0
5	**4,88**	**1,5**	67 ± 14 c	100 ± 0
6	**4,88**	**3**	83 ± 11 c	100 ± 0
7	**7,48**	**0**	75 ± 13 c	91 ± 9
8	**7,48**	**1,5**	58 ± 15 c	100 ± 0
9	**7,48**	**3**	50 ± 15 bc	83 ± 11

Figura 5.2.2. Plantas de mora enraizadas *in vitro* adaptadas a sustrato

Para la variable Indice del contenido de clorofila en la fase *in vitro* se determinó que existió diferencia significativa para la concentración de nitrógeno en el medio (F=12,85, p=<0,0001) con un coeficiente de variación de 5,30. De igual manera para la variable Indice del contenido de clorofila en la fase adaptación a sustrato se determinó que existió diferencia significativa para la concentración de nitrógeno en el medio (F=14,11, p=<0,0001) con un coeficiente de variación de 4,53. La

concentración de 4,88 mM de nitrógeno en el medio, presentó el mayor valor del índice de contenido de clorofila tanto en la fase *in vitro* como en adaptación a sustrato, con valores de 8,16 y 7,79 respectivamente (Cuadro 5.2.7).

Cuadro 5.2.7. Promedio (±) el error estándar del índice de contenido de clorofila (ICC) y actividad del fotosistema II (FSII), en la fase de enraizamiento *in vitro* y adaptación a sustrato, para la concentración de nitrógeno en el medio.

[N] mM	ICC *in vitro*	ICC en sustrato	Actividad FSII *in vitro*	Actividad FSII en sustrato
9,75	4,95 ± 0,44 a	4,33 ± 0,53 a	0,66 ± 0,02 a	0,65 ± 0,03 a
7,48	4,89 ± 0,60 a	6,49 ± 0,52 b	0,70 ± 0,03 ab	0,74 ± 0,02 b
4,88	8,16 ± 0,57 b	7,79 ± 0,34 b	0,75 ± 0,01 b	0,75 ± 0,02 b

En el gráfico 5.2.1 se presenta la regresión lineal entre las variables porcentaje de plantas enraizadas en sustrato e índice del contenido de clorofila en sustrato, para las tres concentraciones de nitrógeno en estudio (R^2=1,00, p=0,03). En el gráfico se observa que el índice del contenido de clorofila mantiene una relación directa con el porcentaje de enraizamiento. De las variables relacionadas, se desprende que a medida que el porcentaje de enraizamiento incrementa, el contenido de clorofila aumenta también en la planta; esto se debe a que las raíces absorben de mejor manera los nutrientes.

Además, el gráfico 5.2.1 muestra que la concentración del nitrógeno en el medio tiene una relación inversamente proporcional tanto con el porcentaje de enraizamiento como con el índice de clorofila; es decir, que las plantas que provienen de una menor concentración de nitrógeno presentan mayor porcentaje de

enraizamiento así como mayor contenido de clorofila. Ya que el índice de contenido de clorofila es inversamente proporcional al grado de estrés (Zarco *et al.* 2000 y Zarco *et al.* 2001), se determina entonces que a menor concentración de nitrógeno en el medio habrá mayor enraizamiento y menor estrés en la planta.

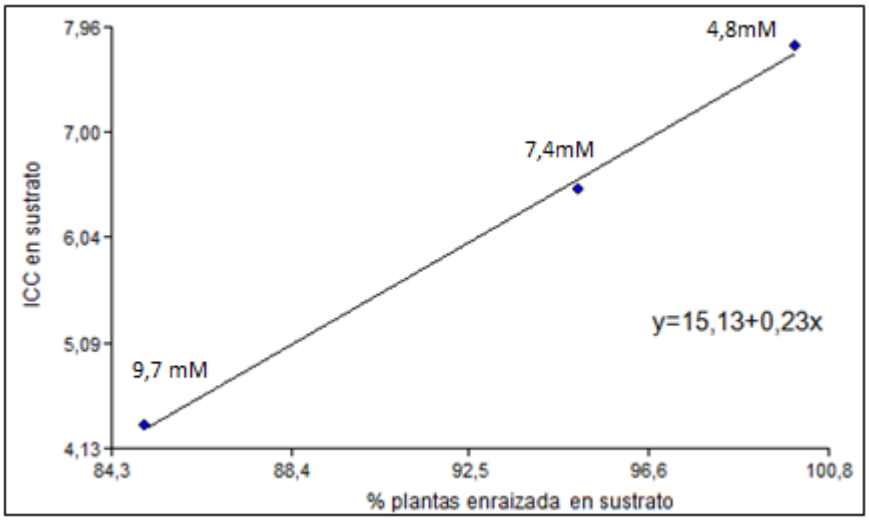


Gráfico 5.2.1. Regresión lineal entre porcentaje de plantas enraizadas e Indice del contenido de clorofila en sustrato, para las tres concentarciones de nitrógeno (mM).

Para la variable actividad del fotosistema II o fluorescencia variable tanto en la fase *in vitro* como de adaptación a sustrato, se determinó que existió diferencia significativa para la concentración de nitrógeno en el medio. Para la fase *in vitro* (F=4,90, p=0,0095) con un coeficiente de variación de 7,95 y para la adaptación a sustrato (F=4,13, p=0,0191) con un coeficiente de variación de 21,78. La mayor fluorescencia variable se obtuvó en los tratamientos con una concentración de 4,88 mM de nitrógeno en el medio, con un valor promedio de 0,75 para ambas fases

(Cuadro 5.2.7). Björkman y Demming (1987) citados por Cerrillo *et al.* (2004), y Zanandrea *et al.* 2006 reportan que 0,83 es un valor considerado óptimo para la fluorescencia variable, para una gran cantidad de especies, en un rango de 0,75 a 0,85 para hojas *ex vitro* no estresadas. Además Zarco *et al.* (2000), indican que los valores de Fv/Fm superiores a 0,83 correspondieron a zonas de estrés bajo, mientras que los valores inferiores a 0,69 correspondieron a zona de estrés alto. En los resultados obtenidos la concentración 9,75 mM de nitrógeno en el medio, presentó valores de Fv/Fm inferiores a 0,66, lo que indica que a mayor concentración de sales en el medio las plantas de mora presentaron mayor estrés.

Para la variable índice del contenido de clorofila (ICC) tanto en la fase *in vitro* como adaptación a sustrato se determinó que existió diferencia significativa para tratamientos. En la fase *in vitro* (F=4,48, p=0,0001) con un coeficiente de variación de 5,30 y en la fase de adaptación a sustrato (F=4,44, p=0,0001) con un coeficiente de variación de 14,53. El T6 (N 4,88 mM + AIA 3 ppm), presentó el mayor índice del contenido de clorofila tanto en la fase *in vitro* como en la adaptación a sustrato, con promedios de 9,29 y 8,28 respectivamente (Cuadro 5.2.8). El contenido clorofílico a nivel de hoja es uno de los indicadores de estrés en vegetación (Zarco *et al.* 2001), cuyo valor relativo es inversamente proporcional al nivel de estrés vegetal, es decir a mayor ICC menor estrés. Entonces, se deduce que la disminución de sales de nitrógeno a la mitad en interacción con 3 ppm de AIA en el medio, al presentar los valores más altos de ICC, las plantas presentaron menor estrés vegetal. Lo que es

un indicativo directo de una mejor condición y sanidad de la planta (Opti-sciences, 2003©).

Cuadro 5.2.8. Promedio (±) el error estándar del índice de contenido de clorofila (ICC) y actividad del fotosistema II (FSII) en *in vitro* y adaptación a sustrato, para los tratamientos.

Trat	[N] mM	[AIA] Ppm	ICC *in vitro*	ICC en sustrato	Actividad FSII *in vitro*	Actividad FSII en sustrato
1	**9,75**	**0**	3,31 ± 0,60 a	4,33 ± 1,22 ab	0,62 ± 0,02	0,67 ± 0,07 ab
2	**9,75**	**1,5**	6,10 ± 0,73 ab	4,85 ± 0,74 ab	0,70 ± 0,03	0,61 ± 0,07 a
3	**9,75**	**3**	5,45 ± 0,76 ab	3,82 ± 0,83 a	0,65 ± 0,02	0,69 ± 0,04 ab
4	**4,88**	**0**	7,78 ± 1,13 bc	7,33 ± 0,70 cd	0,77 ± 0,01	0,68 ± 0,07 ab
5	**4,88**	**1,5**	7,42 ± 0,81 bc	7,76 ± 0,68 cd	0,74 ± 0,02	0,79 ± 0,00 b
6	**4,88**	**3**	9,29 ± 0,99 c	8,28 ± 0,28 d	0,74 ± 0,03	0,78 ± 0,00 b
7	**7,48**	**0**	4,85 ± 1,35 a	7,57 ± 0,90 cd	0,73 ± 0,04	0,78 ± 0,01 b
8	**7,48**	**1,5**	5,38 ± 1,10 ab	6,49 ± 0,97 bcd	0,69 ± 0,06	0,77 ± 0,02 b
9	**7,48**	**3**	4,43 ± 0,83 a	5,50 ± 0,78 abc	0,66 ± 0,05	0,70 ± 0,05 ab

Para la variable fluorescencia en la fase *in vitro* se determinó que no existió diferencia significativa para tratamientos (F=1,46, p=0,1827). Sin embargo se puede resaltar que los tratamientos T4, T5 y T6, presentaron los mayores promedios de flurometría en la fase *in vitro*, con valores entre 0,74 y 0,77 (Cuadro 5.2.8).Según Olivares (2005) el valor de Fv/Fm se ha utilizado como indicador de estrés en plantas, indicando que los valores alrededor de 0,8 son valores fisiológicamente normales.

Los resultados coinciden también, con los reportados por De Paula *et al.* (2010) que indican que plantas bajo condiciones normales, es decir plantas sin factores ambientales potencialmente desfavorables para las plantas (factores de estrés), presentaron promedios de 0,71. Además, Zarco *et al.* (2000), indica que los valores inferiores a 0,69 correspondieron a zona de estrés alto, valores que coinciden con los encontrados en los tratamientos con mayor concentración de nitrógeno, en un rango de 0,62 a 0,69, mayoritariamente en aquellos con adición de AIA. Cerrillo *et al.* (2004) indican haber observado una disminución del valor de fluorescencia variable (Fv/Fm) a medida que las condiciones de stress hídrico se fueron acentuando, los valores oscilaron entre 0,19 y 0,61; mientras que cuando estaban plenamente hídratadas los valores fueron próximos a 0,7. Esto indica que los valores de Fv/Fm son inversamente proporcionales al estrés que presenta la planta, es decir a mayor estrés menor fluorescencia; entonces el presente estudio se deduce que a mayor concentración de nitrógeno en el medio de cultivo se produce mayor estrés en la plantas, medido en los bajos valores de Fv/Fm.

Para la variable actividad del fotosistema II o fluorescencia variable en la fase de adaptación a sustrato, se determinó que existió diferencia significativa para los tratamientos (F=2,38, p=0,0226) con un coeficiente de variación de 12,78. Los tratamientos T5, T6, T7 y T8, presentaron el mayor valor de flurometría esta fase entre 0,77 y 0,79 (Cuadro 5.2.9). Krause y Weis (1991) indican que la relación Fv/Fm ha sido un importante parámetro para determinar el estado fisiológico del

aparato fotosintético en hojas de plantas intactas, indican que los parámetros normales para Fv/Fm están un rango alrededor de 0,832, para gran diversidad de especies y ecotipos. Además, Olivares (2005) indica que Fv/Fm se ha utilizado como indicador de estrés en plantas, indicando que los valores alrededor de 0,8 son valores fisiológicamente normales.

El gráfico 5.2.2 presenta una regresión lineal entre el porcentaje de enraizamiento y la fluorescencia variable *in vitro* (R^2=0,81, p=0,0003), para los tratamientos. La fluorescencia (Fv/Fm) es un parámetro utilizado como indicador de estrés en plantas (Olivares, 2005), por lo que a medida que las plantas enraízan *in vitro* incrementa el valor de la fluorescencia variable, es decir mientras el enraizamiento incrementa hay menor estrés en las plantas. Lo que se observa en los tratamientos T4, T5, T6 y T7, que preseden valores más altos tanto para la fluorescencia como para enraizamiento.

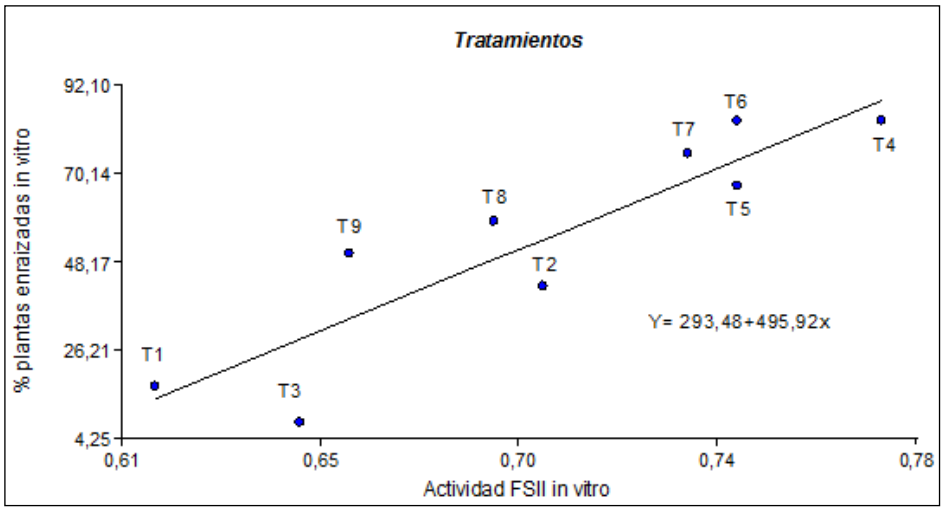


Gráfico 5.2.2. Regresión lineal entre porcentaje de plantas enraizadas *in vitro* y la actividad del fotosistema II *in vitro*, para las concentarciones de los tratamientos (T1:N9,75mM sin auxina, T2: N 9,75mM+AIA 1,5ppm, T3: N9,75mM+AIA 3 ppm,

T4: N 4,88mM sin auxina, T5:N 4,88mM+AIA 1,5ppm, T6:N 4,88+AIA 3ppm, T7: N 7,48mM sin auxina, T8: N 7,48mM + AIA1,5 ppm, T9: N 7,48mM + AIA 3 ppm).

5.3.Determinar el tratamiento más económico para la obtención de plantas completas de *Rubus glaucus* adaptadas a sustrato.

En el cálculo de los costos se realizó un análisis separado por cada fase para facilitar su cómputo. El costo fijo de una planta de mora enraizada *in vitro* es de 0,14 USD y el costo fijo de una planta adaptada a sustrato en la fase *ex vitro* es de 0,21USD (Cuadro 5.3.1).

Cuadro 5.3.1. Costos fijos de producción por fase.

Costos fijos	**USD/expl**
Protocolo de desinfección	0,01
Fase introducción	0,04
Fase multiplicación	0,04
Fase enraizamiento *in vitro*	0,04
Servicios	0,01
Fase *in vitro*	**0,14**
Fase enraizamiento sustrato	0,07
Fase *ex vitro*	**0,21**

El cuadro 5.3.2 muestra los costos variables en la fase de multiplicación, el cual se calcula en función de los tratamientos, en este caso las dosis de BAP adicionados al medio de cultivo. Se observa que la ausencia o adición del regulador de crecimiento al medio de cultivo en la fase de multiplicación, incrementa el costo de producción

en menos de un centavo por planta, siendo el mayor incremento 0,017 centavos de dólar (0,00017 USD) por explante.

Cuadro 5.3.2. Costos variables de producción en la fase de multiplicación *in vitro* de mora.

Costos variables			
BAP	**Trat**	**USD/L**	**USD/expl**
0	0	0	0
0,75	1	0,006	0,00006
1,5	2	0,0114	0,000114
2,25	3	0,0171	0,000171

El costo de producción de una planta de mora de castilla, para la fase de multiplicación *in vitro*, en ausencia y presencia de auxinas es de 0,09 USD por planta (Cuadro 5.3.3). Es decir, que tanto el testigo como el tratamiento con mayor número de brotes (2,25 ppm de BAP) tienen el mismo costo en la fase de multiplicación.

Cuadro 5.3.3. Costos por explante de mora, en la fase de multiplicación *in vitro* de todos los tratamientos.

BAP (ppm)	**Trat**	**Costo fijo**	**Costo variable**	**TOTAL**
		USD/Expl	**USD/Expl**	**USD/Expl**
0	0	0,09	0	0,09
0,75	1	0,09	0,00006	0,09006
1,5	2	0,09	0,000114	0,090114
2,25	3	0,09	0,000171	0,090171

Los costos variables en la fase de enraizamiento *in vitro*, estuvieron dados en función de los tratamientos en estudio, la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo y la adición de AIA. La variación de costos en función de la concentración de nitrógeno fue de 0,3; 0,6 y 0,7 centavos de dólar, en las concentraciones 4,88; 7,48 y 9,75 mM de nitrógeno, respectivamente (Cuadro 5.3.4). Mientras que la adición de AIA en el medio de cultivo no generó costos variables por el bajo costo de la auxina.

Cuadro 5.3.4. Costos variables de producción de las concentraciones de nitrógeno y AIA en el medio, en la fase de enraizamiento *in vitro* de mora.

Costos variables		
[N]	**USD/L**	**USD/expl**
9,75 mM	0,6916	0,007
7,48 mM	0,643	0,006
4,88 mM	0,346	0,003
[AIA]	**USD/L**	**USD/expl**
0,0 ppm	0	0,000
1,5 ppm	0,006	0,000
3,0 ppm	0,012	0,000

El cuadro 5.3.5 presenta los costos variables de los tratamientos en la fase de enraizamiento *in vitro,* es decir la interacción de la concentración de nitrógeno y adición de AIA en el medio de cultivo; en función de esto los costos variaron entre 0,3 y 0,7 centavos de dólar por explante enraizado.

Cuadro 5.3.5. Costos variables de producción en la fase de enraizamiento *in vitro* de mora.

COSTOS VARIABLES		
Tratamientos	**USD/L**	**USD/expl**
T1	0,692	0,007
T2	0,698	0,007
T3	0,704	0,007
T4	0,346	0,003
T5	0,352	0,004
T6	0,358	0,004
T7	0,643	0,006
T8	0,649	0,006
T9	0,655	0,007

Para obtener el costo total de una planta de mora enraizada *in* vitro y adaptada a sustrato, se adicionó los costos fijos de una planta enraizada *in vitro* más los costos variables por tratamiento en la fase de enraizamiento; y ya que el costo de la planta de mora en la fase de multiplicación fue de 0,09 USD para todos los tratamientos (ausencia o presencia de BAP), se tomó el valor de 0,21 por planta de los costos fijos por fase (cuadro 5.3.1), para la elaboración del cuadro 5.3.6, que se muestra a continuación:

Cuadro 5.3.6. Costo total por explante, de una planta de mora enraizada *in vitro* y adaptada a sustrato de todos los tratamientos.

Tratamientos	[N] mM	[AIA] ppm	Costos fijos USD/expl Total	Costos variables USD/expl	TOTAL* USD/Expl
T1	9,75	0	0,21	0,007	0,22
T2	9,75	1,5	0,21	0,007	0,22
T3	9,75	3	0,21	0,007	0,22
T4	4,88	0	0,21	0,003	0,21
T5	4,88	1,5	0,21	0,004	0,21
T6	4,88	3	0,21	0,004	0,21
T7	7,48	0	0,21	0,006	0,22
T8	7,48	1,5	0,21	0,006	0,22
T9	7,48	3	0,21	0,007	0,22

*Total aproximado=costos fijos + costos variables

VI. CONCLUSIONES

- La dosis adecuada de Benzil aminopurina (BAP) que permitió obtener el mayor número de brotes fue 2,25 ppm de BAP, con un promedio de 5,27 brotes por explante, además resultó en la mayor longitud de brote con un promedio de 2,18 cm.
- La concentración 4,88 mM de nitrógeno en el medio permitió la obtención del mayor número de raíces, longitud de raíces, porcentaje de enraizamiento *in vitro* y porcentaje de enraizamiento en sustrato, con promedios de 3,72 raíces por explante, 1,8 cm, 78% y 100%, respectivamente.
- La interacción auxina y concentración de nitrógeno en el medio fue determinante; ya que los tratamientos T4: [N] 4,88 mM sin auxinas y T6: [N] 4.88 mM + AIA 3 ppm, permitieron la obtención del mayor porcentaje de enraizamiento *in vitro,* con 83% de plantas enraizadas. Además, T6: [N] 4.88 mM + AIA 3 ppm presentó el menor nivel de estrés vegetal, medido mediante los altos índices de contenido de clorofila (ICC) y actividad del fotosistema II (Fv/Fm).
- El costo de una planta en fase de multiplicación *in vitro* fue de 0,09 USD, para todos los tratamientos. En la fase de enraizamiento los tratamientos T4: [N] 4,88 mM sin auxinas; T5: [N] 4.88 mM + AIA 1,5 ppm y T6: [N] 4.88 mM + AIA 3 ppm, presentan el menor costo por planta completa de *Rubus glaucus,* adaptada a sustrato con un valor de 0,21USD por planta.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda la adición de 2,25 ppm de BAP en la fase de multiplicación de mora de castilla, para la obtener el mayor número de brotes.
- La disminución de la concentración de nitrógeno a la mitad, es decir 4,88 mM de nitrógeno en el medio de cultivo, es recomendable en la fase de enraizamiento *in vitro* en mora de castilla para obtener altos porcentajes de enraizamiento. Además, se recomienda la adición de 3 ppm de AIA, para evitar el estrés de la plantas.
- En función de los costos y resultados obtenidos en la presente investigación, se recomienda adicionar 2,25 ppm de BAP en el medio de multiplicación y disminuir los nitratos a 4,88 mM en ausencia de auxinas o adición de Acido indol acético (AIA, 3ppm) en la fase de enraizamiento *in vitro*, para la obtención de plantas completas de mora de castilla a un costo de 0,21USD por planta adaptada a sustrato.

X. ANEXOS

Anexo 1. Componentes de médio MS (Murashige y Skoog, 1962)

Constituyente	Concentración de la solución madre (g/L)
Macros	
NH_4NO_3	16,5
KNO_3	19
$CaCl_2.2H_2O$	4,4
$MgSO_4.7H_2O$	3,7
KH_2PO_4	1,7
Micros	
$MnSO_4.H_2O$	1,69
$ZnSO_4.7H_2O$	0,86
H_3BO_3	0,62
KI	0.083
$Na_2MoO_4.2H_20$	0.025
$CuSO_4.5H_2O$ 10 ml de solucón 25 mg/100ml	
$CoCl_2.6H_2O$ 10 ml de solución 25 mg/100ml	
Fuente de hierro	
$FeSO_4.7H_2O$	0.00556
$Na_2EDTA.2H_2O$	0.00746
Vitaminas	
Inositol	10
Nicotínico	0,05
HCl-Piridoxina	0,05
Glicina	0,2
HCl-Tiamina	0,01

Anexo 2. Fotosíntesis y su medición mediante el equipo flurómetro OS-30p

A2.1. FOTOSINTESIS

La fotosíntesis es el único mecanismo de entrada de energía del mundo viviente, en donde participan tanto la oxidación como la reducción. El proceso global es una oxidación de agua (eliminación de electrones en forma de H^+, con liberación de oxígeno como subproducto) y una reducción de dióxido de carbono (CO_2) para formar compuestos orgánicos $(CH_2O)n$ (Salisbury y Ross, 2002©).

La energía lumínica es convertida en energía química, en el cloroplasto, mediante dos grupos independientes de pigmentos o fotosistemas (Taiz y Zeiger, 2003©). El fotosistema I (FS I o P700) mide las longitudes de onda largas, máximo de absorción a 700nm. El segundo fotosistema, el fotosistema II (FS II o P680), absorbe longitudes de onda menores de 690nm (Salisbury y Ross, 2002©).

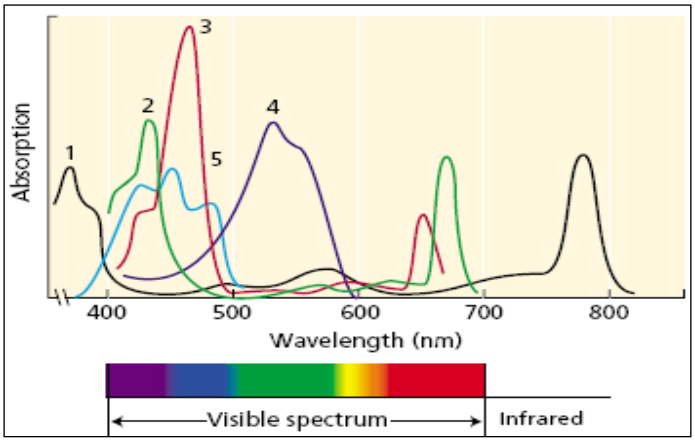


Figura A2.1. Longitud de onda absorbida en la fotosíntesis (Taiz y Zeiger, 2003©)

Estructuras y pigmentos fotosintéticos

El tejido fotosintético más activo en las plantas es el mesófilo. Las células del mesófilo tiene muchos cloroplastos, éstos últimos se encuentran rodeados de un sistema de doble membrana o envoltura que controla el tránsito de las moléculas. En el interior del cloroplasto se encuentra el estroma, que contiene enzimas que convierten el dióxido de carbono (CO2) en carbohidratos. Embebidos por el estroma se encuentran el tercer sistema de membranas, los tilacoides, que son vesículas que contienen proteínas y pigmentos. En algunas porciones del cloroplasto se encuentran tilacoides apilados, que se denominan granas, la zona en donde los tilacoides tiene contacto se llama región apresada (Salisbury y Ross, 2002©; Taiz y Zeiger, 2003©).

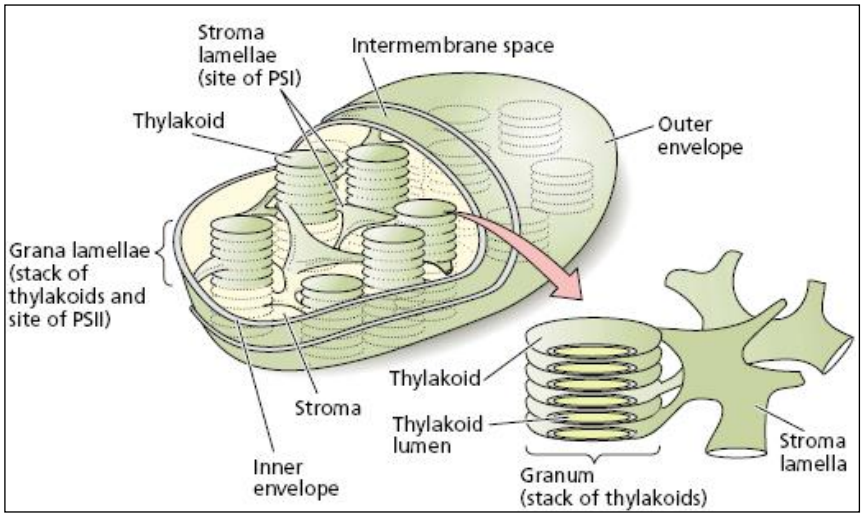


Figura A2.2. Estructura del cloroplasto (Taiz y Zeiger, 2003©).

Los pigmentos existentes en las membranas tilacoidales son principalmente dos tipos de clorofilas verdes, clorofila a y clorofila b. Existen también pigmentos amarillo-

naranja, denominados carotenoides, que son de dos tipos: los carotenos y las xantofilas (Salisbury y Ross, 2002©).

Estructura de la Clorofila

Las clorofilas verdes son la clorofila a ($C_{55}H_{72}MgN_4O_5$) y clorofila b ($C_{55}H_{70}MgN_4O_6$). La estructura de la molécula de clorofila tiene dos partes: un anillo de *porfirina* (sustituida con pequeños grupos enlazados, *sustituyentes*) y una cadena larga llamada *fitol*.

La estructura de la porfirina posee anillos formados por hidrocarburos en su mayoría (carbonos de metano y carbonos betapirrolíticos) causantes de las reacciones electrolíticas (nucleofílicas y electrofílicas) a las que se ven sometidas las porfirinas. En el centro del anillo se encuentra un átomo de magnesio (Mg^{2+}), que se direcciona dentro de este catalizando los procesos energéticos que ocurren dentro de la porfirina. La estructura permite que en su interior puedan fluir libremente electrones, los cuales son trasportados y localizados en otros sitios, actuando en dos procesos fundamentales de la vida: la fotosíntesis y la respiración aeróbica (Taiz y Zeiger, 2003©).

Las interacciones con otras moléculas pueden causar que la porfirina sea metalizada o desmetalizada. En este último caso, se convierte en agente que cataliza la síntesis en forma tóxica de oxígeno. De esta forma las porfirinas se excitan cuando incide sobre su superficie radiación electromagnética de ciertas longitudes de onda, haciendo que sus electrones salten de un nivel energético a otro con mayor energía, trasmitiendo su energía a otras moléculas con enlaces apropiados para la producción de oxígeno monoatómico, y radicales libres (Taiz y Zeiger, 2003©).

El *fitilo* (o *resto de fitol*; llamamos resto o residuo a la parte de una molécula incorporada a la estructura de otra mayor) es una cadena hidrocarbonada con restos de metilo (-CH_3) a lo largo. Tiene, como todas las cadenas orgánicas basadas sólo en C e H, un carácter "hidrófobo"; es decir, que repele al agua. La cadena del fitilo sirve para anclar la molécula de clorofila en la estructura anfipática de los complejos moleculares en que residen las clorofilas (Taiz y Zeiger, 2003©).

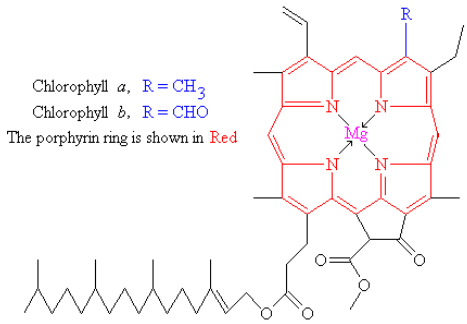


Figura A2.3. Molécula de la clorofila (Taiz y Zeiger, 2003©).

Los cuatro complejos de tilacoides

Según Salisbury y Ross (2002©), los cuatro complejos integrales de la membrana tilacoidal, actúan de la siguiente manera:

- Fotosistema II oxida agua a oxígeno en el lumen tilacoidal y libera el proceso de protones (H+).
- Citocromo b_6f recibe electrones (e-) desde el fotosistema II y los entrega al fotosistema I. Adicionalmente transporta protones desde el estroma hasta el lumen, contribuyendo al gradiente electroquímico.
- Fotosistema I reduce $NADP^+$ a NADPH en el estroma por acción de la ferrodoxina y la flavoproteina ferrodoxina $NADP^+$ reductasa.
- Los protones (H+) se difunden desde el lumen hacia el estroma, ATP sintetasa que es un grupo de polipéptidos que convierte al ADP y fosfato inorgánico en ATP y H_2O.

Absorción de luz

La luz representa la porción de energía radiante con longitudes de onda visibles para el ojo humano (comprendidas entre 390 y 760 nm). La luz tiene propiedades de partícula y de onda, como onda está caracterizada por la longitud, que es la distancia sucesiva entre las crestas de las ondas, y la frecuencia que es el número de crestas que pasan en un tiempo determinado. Y como partícula, la luz es denominada fotón, contiene energía llamada quantum (Salisbury y Ross, 2002©; Taiz y Zeiger, 2003©).

Complejos de absorción de luz

Una porción de la energía luminosa absorbida por la clorofila y los carotenoides, es eventualmente almacenada como energía química, ésta conversión de energía es un proceso complejo que depende de la cooperación entre varios pigmentos y proteínas que transfieren energía. La mayoría de pigmentos sirve como un complejo *antena,* capturando luz y transfiriendo la energía al complejo *centro de reacción*, en donde las reacciones de oxidación y reducción que almacenan energía tienen lugar (Taiz y Zeiger, 2003©).

Principio fundamental de la absorción de luz

Cualquier molécula sólo puede absorber un fotón al mismo tiempo, y que ese fotón producirá la excitación de un solo electrón. Los electrones que tienen un estado basal estable son los que generalmente resultan excitados (Salisbury y Ross, 2002©).

La energía de excitación puede perderse por completo por la liberación de calor, se presenta cuando el electrón regresa a su estado basal. Una segunda forma en que algunos pigmentos pueden perder energía de excitación es debido a una combinación de pérdida de calor y ***fluorescencia***, ésta última es la producción de luz que acompaña a la rápida disminución de energía en los electrones que se encuentran en estado excitado. En la hoja la fluorescencia es débil porque la energía es utilizada para la fotosíntesis (Salisbury y Ross, 2002©).

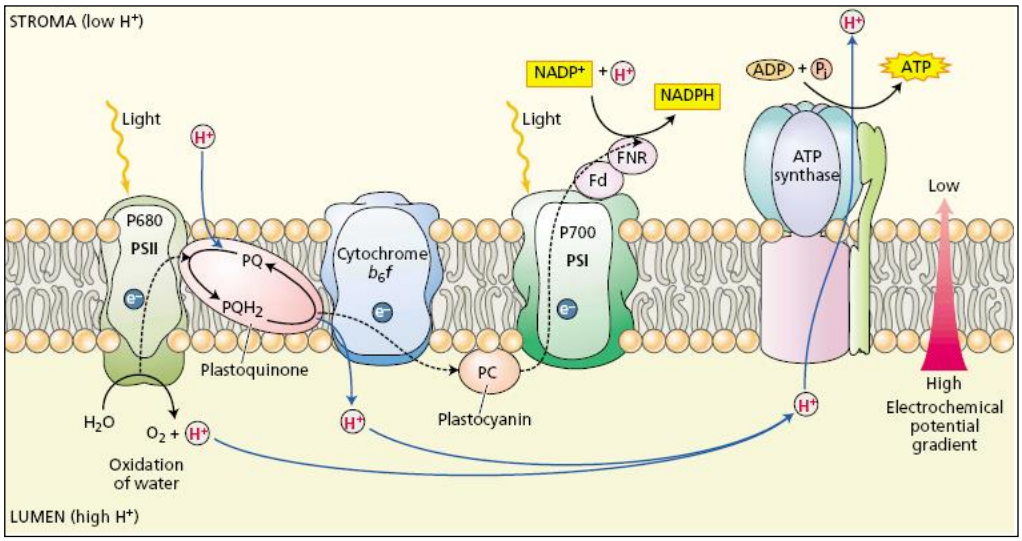


Figura A2.4. Complejos tilacoidales y las reacciones lumínicas durante la fotosíntesis (Taiz y Zeiger, 2003©).

Efecto Kautsky

La fluorescencia clorofílica emitida por hojas adaptadas a la oscuridad fue descrita por primera vez en los años 30 por Kautsky y Hirsch (1934), demostrando que la fluorescencia clorofílica varía en función del tiempo y la iluminación a que se ven sometidos los fotosistemas (Pérez, 2004).

La energía lumínica utilizada por las plantas en la fotosíntesis es absorvida por pigmentos fotosintéticos, con el espectro de absorción cubriendo un amplio rango de energía lumínica disponible. Los principales pigmentos que absorben la energía son la clorofila a y la clorofila b. La energía lumínica absorbida por el cloroplasto primero excita a las proteínas de clorofila cosechadoras de luz, conocidas como

complejos cosechadores de luz (CCL). Estas proteínas (CCL) transfieren su energía al fotosistema I o al fotosistema II. Estos fotosistemas contienen un centro de reacción en sus pigmentos para la conversión de energía lumínica absorbida a potencial de oxidación y reducción para transportar electrones en la oscuridad. La luz absorbida inicialmente por los CCLs y transferida a los centros de reacción, puede perderse por diferentes mecanismos. Aproximadamente del 3-9% de la luz absorbida por los pigmentos clorofílicos, es reemitida desde el primer momento de excitación, como fluorescencia. El pico de la emisión es una longitud de onda mas larga que la energía de excitación. Este efecto fue observado 100 años atrás, cuando Müller (1874) lo visualizó utilizando filtros de vidrio de colores. Él también notó que los cambios de fluorescencia que ocurren en las hojas verdes están correlacionados con la asimilación fotosintética. La falta de equipos adecuados no permitió una investigación más detallada del fenómeno. La energía lumínica absorbida por los centros de reacción conduce al electrón a través del FS II y FS I permitiendo la oxidación del agua, evolución del oxígeno, la reducción de $NAPD^{+}$ a NADPH, transporte de protones a través de la membrana y eventualmente la síntesis del ATP (Opti-sciences, 2004©).

La perdida de energía lumínica como fluorescencia, desde el centro de reacción proviene inicialmente desde la reacción del FS II. Cuando los cloroplastos u hojas han sido adaptados en la oscuridad, las reacciones de oxidación y reducción median el camino de regreso en el transporte de electrones, a un nivel común. Al iluminar

una hoja adaptada a oscuridad, hay un rápido incremento en la emisión de luz en la fluorescencia del FS II seguido por una serie de oscilaciones lentas. Esto se denomina “Efecto Kautsky”, nombrado así por el investigador quien estudio el fenómeno a detalle (Kautsky y Hirsch 1931). La figura A2.5 presenta el usual encendido kinético de la emisión fluorescente de una hoja típica adaptada a la oscuridad. Los cambios en la intensidad de la emisión de fluorescencia en las hojas adaptadas a la oscuridad son sensibles a los cambios en los aparatos fotosintéticos. Los muchos años de estudio de la fluorescencia de la clorofila, para analizar su relación con la fotosíntesis y características de la fotosíntesis, han presentado que cualquier cambio inusual en todo el estado bioenergético de la planta puede ser detectado por un cambio en la fluorescencia clorofílica. Esto incluye todas las reacciones desde la oxidación del agua através del transporte de electrones, desarrollo del gradiente electroquímico, síntesis de ATP y eventualmente la serie de reacciones enzimáticas para la reducción de CO_2 a carbohidratos en la hoja. Incluso cambios en la planta como la apertura de estomas e intercambio de gases con la atmósfera se reflejan en cambios en las características de fluorescencia de la hoja (Opti-sciences, 2004©).

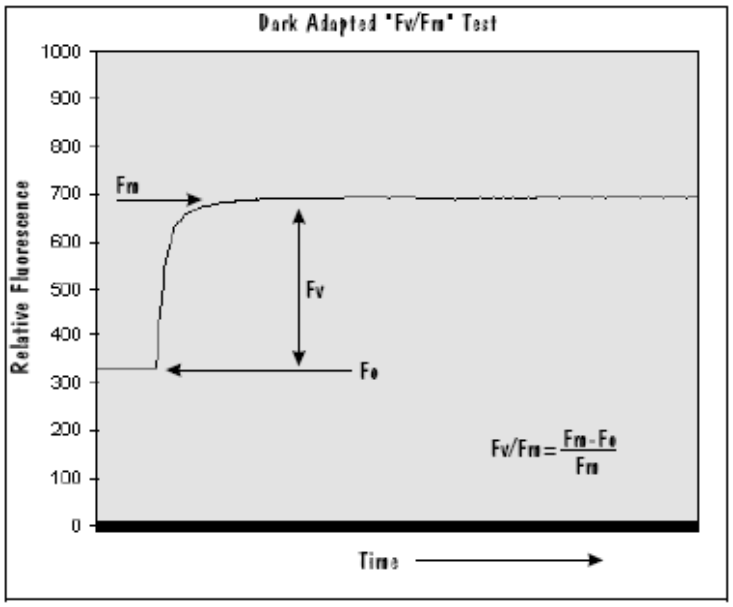


Figura A2. 5. Test de adaptación a la oscuridad

A2.2. FLUOROMETRO: equipo de medición de actividad del fotosistema II

Chlorophyll Fluorometer OS-30p

El OS-30p automáticamente mide y calcula los siguientes parámetros:

Mide:

Fo: fluorescencia mínima (unidad arbitraria). Fluorescencia que ocurre cuando todas las antenas están supuestamente abiertas (hojas adaptadas a la oscuridad).

Fm: Fluorescencia máxima (unidad arbitraria). Intensidad de la fluorescencia bajo la exposición de un flash. Se asume que todas las antenas están cerradas.

Ftr: Fluorescencia terminal (unidad arbitraria). Valor de la fluorescencia apagada en el final del test.

T1/2: (mS o uS) La mitad del incremento del tiempo, desde la medición de Fo a Fm.

Calculado:

Fv/Fm: la proporción de la variable fluorescencia a la máxima fluorescencia. Se calcula como Fv/Fm= [Fm-Fo]/Fm.

La fluorescencia variable (Fv) es el cambio en la fluorescencia debido a la reserva del electrón inicial en el complejo antena (Opti-sciences, 2004©).

Anexo 3. La clorofila y la medición del Indice del Contenido de Clorofila (ICC)

Aspectos generales de la clorofila

La clorofila es un típico pigmento de los organismos fotosintéticos, pero todos estos organismos contienen más de uno de este tipo de pigmentos, cada uno sirve para una función específica. En las plantas los pigmentos que hay en las membranas tilacoidales consisten principalmente en dos tipos de clorofilas verdes, la clorofila a y la clorofila b. Todas las clorofilas están contenidas en la membrana de los cloroplastos, el lugar donde se llevan a cabo las reacciones lumínicas de la fotosíntesis (Taiz y Zeiger, 2003©).

Técnicas de medición de Indice del contenido de clorofila

El contenido clorofílico a nivel de hoja es uno de los posibles indicadores de estrés en vegetación (Zarco *et al.* 2001). La estimación del contenido de pigmentos en vegetación es un indicativo directo de la condición y sanidad de la planta (Opti-sciences, 2003©).

Para estimar la clorofila existen diferentes métodos, procedimientos y modelos mateméticos desarrollados con el objetivo de minimizar los errores ocasionados por la presencia de otros pigmentos fotosintéticos (Rivera *et al.* 2005). Algunos de los métodos tradicionales de tipo estadístico, para la estimación del contenido de pigmentos mediante la teledetección, son: a) mediante relaciones estadícticas directas establecidas entre datos obtenidos en campo de contenido clorofílico medido en

muestras foliares y datos de reflectancia de cobertura vegetal; b) mediante la aplicación a datos de reflectancia de la cobertura de relaciones obenidas a nivel de hoja entre contenido clorofílico e índices ópticos; c) mediante la utilización de modelos de transferencia rasiativa de cobertura y relaciones a nivel de hoja entre índices ópticos y pigmentos; d) mediante inversión de modelos de transferencia radiativa a nivel de hoja y de cobertura a partir de datos de reflectancia, obteniendo estimaciones de contenido clorofílico sin necesidad de datos de campo (Zarco *et al.* 2001). Otros métodos como la cromatografía moderna permiten la cuantificación exacta de la clorofila y todos sus derivados, sin embargo este tipo de metodologías es de acceso limitado. El método espectrofotométrico puede estar fuertemente sesgado por el estado fisiológico de la clorofila, el método fluorométrico es más sensible y preciso en la cuantificación de la clorofila ya que no se ve afectado por al presencia de feopigmentos y clorofila-b en la muestra. (Rivera *et al.* 2005).

Chlorophyll meter CCM-200

La clorofila tiene varias distintas absorbacias ópticas, características que el CCM-200 explota para determinar la concentración relativa de clorofila. Las bandas de fuerte absorbancia están presentes en el azul y rojo, pero no en las bandas verde o infrarrojo (Figura A3.1) (Opti-sciences, 2003©).

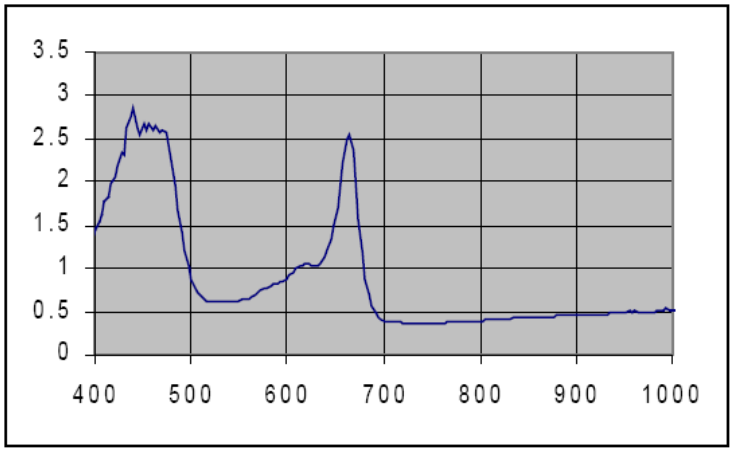


Figura A3.1. Absorvancia de la clorofila (Opti-sciences, 2003©).

El CCM-200 usa la absorbancia para estimar el contenido de clorofila en el tejido de la hoja. Dos longitudes de onda son usadas para la determinación de la absorbancia. Una longitud de onda cae en el rango de absorbancia de la clorofila mientras la otra sirve para compensar las diferencias mecánicas como el espesor del tejido. El CCM-200 mide la absorbancia de ambas longitudes de onda y calcula en ICC (Índice del contenido de clorofila) valor que es proporcional a la cantidad de clorofila en la muestra. El valor de ICC es un valor relativo. El contenido absoluto de la clorofila por unidad de área no es computado (Opti-sciences, 2003©).

XI. BIBLIOGRAFÍA

Alev, C. y Arslan, O. 2006. Efficiente micropropagation of English Shrub Rose "Heritage" under *in vitro* conditions. Rev. International Journal of Agrivulture & Biology. Vol. 8, No. 5, 2006. 626-629p.

Almeida, J. y Contreras, I. s.f. Propagación *in vitro* de Mora de Castilla (*Rubus glaucus*) a partir de miniestacas. Universidad de los Andes, Mérida – Venezuela. Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Laboratorio de cultivos *in vitro* – Centro de ingeniería genética. Publicado en Ecofisiología y Fisiología vegetal. 162p.

Angarita, A. y Perea, M. 1991. Micropropagación de plátanos y babanos, Cultivo de tejidos en la agricultura. Eds. Roca y Mroginski. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 495-512 p.

Arellano, M. y Mantilla, J. 2007. Incidencia a la aplicación de inductores naturales y de síntesis sobre la brotación y producción en mora de castilla (*Rubus glaucus*). *Tesis.* Ingeniero Agropecuario. Sangolquí - Ecuador. Facultad de Ciencias Agropecuarias -IASA de la Escuela Politécnica del Ejercito.

Alvarado, A. 2002. Mora (*Rubus*) (en línea). Consejo Nacional de Producción, Dirección de Mercadeo y Agroindustria. Boletín quincenal 19. Junio/2002. Costa Rica. Consultado el 7 jul 2009. Disponible como: mora_junio_2002.pdf

Asadi, A. Vedadi, C. Rahimi, M. y Naserian, B. 2009. Effect of plant growth hormones on root and shoot regeneration in Rose (*Morrasia*) under *in-vitro* conditions.

Azadi, P. Khosh-Khui, M. Beyramizadeh, E. y Bagheri, H. 2007. Optimization of factors affecting *in vitro* proliferation and rooting of *Rosa hybrida* L. *cv*. Rafaela. International Journal of Agricultural Research, 2: 626-631.

Bernal, J. Rojas, A. e Hine, A. 2009. Optimización del proceso de enraizamiento y aclimatación de vitroplantas de *Swietenia macrophylla* King (Orden: Maliacea). *Rev.* Tecnología en marcha, Vol. 22, N° 3, Jul-Sep 2009, pp: 34-41.

Björkman, O. y Demming, B. 1987. Photon yield of O2 evolution and chlorophyill fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origin. *Rev.* Planta, New York, V. 170, p. 489-504.

Bonilla, H. y Gallegos, A. 2001. Identificación de los principales síntomas de deficiencias nutrimentales en mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth). *Tesis.* Ingeniero Agropecuario. Sangolquí - Ecuador. Facultad de Ciencias Agropecuarias - IASA de la Escuela Politécnica del Ejercito.

Cañizares, D. 1998. Regeneración de Caricaceas (*Carica pentagona*) por métodos de micropropagación. *Tesis.* Ingeniero Agropecuario. Sangolquí - Ecuador. Facultad de Ciencias Agropecuarias -IASA de la Escuela Politécnica del Ejercito.

Castro, J. y Cerdas, M. 2005. Mora (*Rubus* spp.) Cultivo y Manejo Poscosecha (en línea). Ministerio de Agricultura y Ganadería Universidad de Costa Rica, Consejo Nacional de producción. Consultado el 11 oct. 2010. Disponible como: http://www.mag.go.cr/bibioteca_virtual_ciencia/manual_mora_indice.html

Castro, D. y Gaviria, G. 1995. Propagación *in vitro* de especies del género *Rubus*. Investigaciones Universidad Católica de Oriente, Antioquia (Colombia), pp. 3-9

Centro Agrícola de Quito (CAQ). 1992. Manual técnico del cultivo de la mora de castilla. Convenio C.A.F. Quito-Ecuador. 3-11pp.

Cerrillo, R. Maldonado, R. y Ariza, D. 2004. Fluorescencia de la clorofila en cinco procedencias de *Pinus halepensis* Mill y su respuesta a estrés hídrico. *Rev.* Cuad. Soc. Esp. Cie. For. 17:69-74.

CICO (Centro de información e inteligencia comercial). 2009. Perfiles de mercado: Perfil de Mora. CICO de CORPEI, Quito – Ecuador. 21p.

De Carvalho, J. Moreira, U. y Alves, E. 2008. Evaluation of a portable chlorophyll meter to estimate chlorophyll concentrations in leaves of tropical wood species from Amazonian forest. *Rev.* Hoehnea35(2):185-188

De Paula, D. De Aquino, T. Stacciarini, E. y Batista, J. 2010. Fluorescência e teores de clorofilas em Abacaxizeiro cv. Pérola submetido a diferentes concentrações de sulfato de amônio. *Rev.* Bras. Frutic. , Jaboticabal – SP, v.32, n.2, p. 360-368.

Ellena, M. 1998. Aspetti fisiological e biochimici asociati al processo rizogenético del Castagno da frutto e Nocciolo. Universidad de Bologna. Departamento de Cultivos Arbóreos. Italia. 157 p.

Enríquez, V. y Díaz, B. 1994. Experiencias sobre propagación *in vitro* de plantas. Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca. Serie cuadernos de los centros N° 1. 37p.

Franco, G. y Giraldo, M. 1999. El cultivo de mora (en línea). Proyecto de transferencia de tecnología sobre el cultivo de mora - PRONATTA. CORPOICA -

Colombia. Consultado el 16 ago. 2009. Disponible como: Cultivo%20de%20la%20mora.pdf

Gargia, J. 1991. Fitohormonas: Tratamientos hormonales en frutales. Fruticultura professional, Nº 37. España. 18-29 p.

González, S. 2003. Tema 5: Medios de cultivo (en línea). Departamento de Biología vegetal, Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Consultado el 10 oct. 2006. Disponible en: http://fbio.uh.cu/webfv/docencia/tema5.doc

González, S. Perales, H. y Salcedo, M. 2008. La fluorescencia de la clorofila-*a* como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Rev.* Eduación bioquímica, Vol. 27, N° 4, 2008:119-129.

Hartmann, T. y Kester, D. 1997. Plant Propagation: Principles and practices. Prentice Hall, New Jersey. 820 p.

Henríquez, E. 2004. Evaluación de tres factores de enraizamiento en estacas de morera (*Morus alba*). *Tesis.* Ingeniero Agrónomo. Santiago - Chile. Facultad de Ciencias Agrónomas. Escuela de Agronomía. Universidad de Chile.

Hernández, C. Lopera, M. Mora, B. y Cárdenas, J. 1999. Desarrollo de un protocolo de propagación masiva de la mora de Castilla (*Rubus glaucus*) mediante la utilización del cultivo de tejidos *in vitro.* Actual Biol 21(70):3-12

Hyndman, S. Hasegawa, P. y Bressan, R. 1982a. The role of sucrose and nitrogen in adventitious root formation on culture rose shoots. *Rev.* Plant Cell Tissue Organ Cult 1982;1:229– 38.

Hyndman, S. Hasegawa, P. y Bressan, R. 1982b. Stimulation of root initiation from culture rose shoots through the use of reduced concentrations of mineral salts. *Rev.* Hortic. Sci. 17: 82-83

Jordan, M. y Velozo, J. 1997. *In vitro* propagation of highlands papayas (*Carica pubescens* anda *C. pentagona*). Pontificia Universidad Católica de Chile, Hort.Biotech. In Vitro Cult. And Breeding. Acta Hort. 447, ISHS. 103 – 106p.

Kenneth, G. y Torres, C. 1989. Tissue culture techniques for horticultural crops. Published by Van Nostrand Reinhold, New York, USA. 285 p.

Kirichenko, E. Kuz'-mina, T. y Kataeva, N. 1991. Factors in optimizing the multiplication of ornamental ans essential oil roses *in vitro*. Bûll Gl Bot Sada 1991; 159:61-7.

Krause, G. y Weis, E. 1991. Chlorophyl florescence and phptosynthesis: The Basics. *Annu. Rev.* Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1991, 42:313-349.

Krikorian, A. 1991a. Medios de cultivo. Generalidades, composición y preparación, *in* Cultivo de tejidos en la agricultura. Eds. Roca y Mroginski. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 41-78 p.

Krikorian, A. 1991b. Propagación clonal *in vitro*, *in* Cultivo de tejidos en la agricultura. Eds. Roca y Mroginski. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 95-126 p.

Ledin, B. 1955. *Rubus* trials in South Florida (en inglés). Florida StateHorticultural Society. Sub-Tropical experiment Station. 272 -274 pp.

Luna, C. Tarragó, J. Sansberro, P. Mroginski, L. 2004. Enraizamiento *in vitro* de *Ilex dumosa* R. Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Ciencias Agrarías, Instituto de Botánica del Nordeste. Comunicaciones y Científicas 2004, Resumen: A-015.

Ma, Y. Byrne, D. y Chen, J. 1996. Propagation of rose species *in vitro*. *Rev.* In vitro cell. Dev. Biol – Plant 32:103-108, April-June 1996.

Margara, J. 1986. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Ediciones Mundiprensa. Madrid, España. 230 p.

Marulanda, M. Carvajalino, M. y Vento, H. 2000. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de plantas seleccionadas de *Rubus glaucus* Benth para el departamento de Risaralda (Colombia). Actual Biol 22 (73): 121-129p.

Marassi, M. 2004©. Hormonas vegetales (en línea). Universidad Nacional del Noroeste. Facultad de Agroindustrias y Facultad de Ciencias Agrarias. República Argentina. Consultado el 04 feb. 2007. Disponible en: http://fai.unne.edu.ar/biologia/plantas/hormona.htm

Muñoz, I. y Reyes, H. 2006. Establecimiento de reguladores de crecimiento, L-Cisteina y ácido ascórbico en el cultivo in vitro (*Rubus glaucus*). *Tesis.* Universidad Nacional Agraría. Facultad de Agronomía. Managua - Nicaragua

Murashige, T. **1974**. Plant Propagation Throught tissue culture. Ann. Rev. Plant. Phisiology. 25: 136-137.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. Arevised médium for rapad groeth and bioassays with tocacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Olivares, E. 2005. Efecto de la sequía sobre la eficiencia fotoquímica del PSII en *N. dombeyi* (Mirb.) Oerst. *Tesis*. Lic. en Ciencias Biológicas. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias. Valdivia – Chile.

Opti-sciences, Inc. 2003©. CCM-200 Chlorophyll Content Meter Operation Manual. Hudson. 32p.

Opti-sciences, Inc. 2004©. OS-30p Chlorophyll Fluorometer Operation Manual. Hudson. 51p.

Pati, P. Prasad, S. Sharma, M. Sood, A. y Ahuja, P. 2005. In vitro propagation of rose - a review. Biotechnology advances. Science Direct. 95-111p.

Pérez, O. 2004. Detección de estrés hídrico en olivar mediante fluorescencia clorofílica, métodos de espectroscopía y teledetección térmica. *Tesis* para la obtención del Titulo de Ingeniero Agrónomo. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Unversidad de Córdoba.

Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundi – Prensa. Madrid – España. 319 p.

Programa fitosanitario para el agro para la mitigación de barreras técnicas del acceso al mercado de EEUU (PROFIAGRO). 2007. Estudio de factibilidad de mora. Quito – Ecuador. 5 - 22p.

Ramírez, A. y Angarita, A, 1990. Estudios preliminares para la propagación clonal *in vitro* de mora (*Rubus glaucus* L.). Agron. Colomb 7(1-2):17-25

Ramírez, C. Carrizosa, M. Rivera, D. y Linares, E. 1998. Conservación del germoplasma de moras silvestres (*Rubus spp.*) de la cuenca del río del Palmar municipio de Ubaque (Cundinamarca, Colombia). II: Conservación y manejo *ex situ.* Plant Genetic Resources Newsletter 115:13-22.

Raisman, J. y González, A. 2008©. Reproducción asexual (en línea). Universidad Nacional del Noroeste. Facultad de Agroindustrias. Hipertextos del área de biología. República de Argentina. Consultado el 16 ago. 2012. Disponible en: http://www.biologia.edu.ar/reproduccion/asexual.htm

Raymundo, J. Carrillo, G. Rodríguez, J. 2005. Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia.* Rev. Fitotec. Mex. Vol. 28 (2):175-178, 2005

Reyes, H. y Hewstone, N. 1994. Cultura de tejidos en la agricultura. Tierra Adentro Nº24 Pp 30-33.

Rivera, C. Zapata, A. Pinilla, G. Donato, J. Chaparro, B. y Jiménez, P. 2005. Comparación de la estimación de la clorofila-*a* mediante los métodos espectrofotométrico y fluorométrico. *Rev.* Acta Biológica Colombiana, Vol. 10 N° 2, 2005, 95-103.

Roca, W. y Mroginski, L.1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, Cultivo de tejidos en la agricultura. Eds. Roca y Mroginski. Centro Internacional de Agricultura. Cali, Colombia. 19-40 p.

Rogers, R. y Smith, M. 1992. Consequences of *in vitro* and *ex vitro* root initiation for miniature rose production. J Hortic Sci. 1992;67: 535-40.

Salek, M. y Tarinejad, A. 2011. *In vitro* multiplication of Rose (*Rose hybrida* cv. Baccara). *Rev.* American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 11 (1): 111-116, 2011.

Salisburry, F. y Ross, C. 2002©. Fisiología de las plantas. Ed. Paraninfo S.A. Madrid – España. 333-355, 569-636, 649p

Seemann y Barriga. 1993. Utilización de técnicas de micropropagación. Avances en producción y sanidad vegetal. Cultivos no tradicionales. Ed Universitaria. 230 p.

Smith, R. 2000©. Plant Tissue Culture. Second Edition. Department of Soil and Crop Sciences, Texas A&M University (United State). 44-55p.

Tadesse, M. Lommen, W. y Struik, P. 2000. Effect of *in vitro* yteatments on leaf area growth potato transplants during acclimatation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 61:59-67.

Taiz, L. y Zeiger, E. 2003©. Plant Physiology. Third edition. Sinauer Associates. 72, 690p.

Toro, M. 2004. Establecimiento de protocolos para regeneración *in vitro* de cerezo dulce (*prunus avium* l.) Var. Lambert. *Tesis.* Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad Católica de Temuco. Temuco – Chile.

Vaca, I. 2008. Incremento del número de brotes de babaco (*Vasconcellea x Heilbornii cv Babaco) in vitro* mediante la interacción de reguladores de crecimiento para la regeneración de plantas completas. . *Tesis.* Ingeniero Agropecuario. Sangolquí - Ecuador. Facultad de Ciencias Agropecuarias (IASA) - Escuela Politécnica del Ejercito (ESPE).

Wu, J. Miller, S. Hall, H. y Mooney, P. 2009. Factors affecting the efficiency of micropropagation from lateral buds and shoot tips of *Rubus*. Rev. Plant Cell Tiss Organ Cult (2009) 99:17–25

Zanandrea, I. Bacarin, M. Schmitz, D. Bolacel, E. Peters, J. 2006. Chorophyll fluorescence *in vitro* cultivated apple. *Rev.* Bras. Agrociência, Pelotas, V. 12, N° 3: 305-308.

Zarco, P. Miller, J. Mohammed, G. Noland, T. y Sampson, P. 2000. Utilización de moelos de reflectancia como nexo entre muestras foliares y la cobertura forestal: aplicación a datos espectrales. Center for research in Earth and Space Science (CRESS), York University, Toronto, Ontario, Canadá.

Zarco, P. Miller, J. Mohammed, G. Noland, T. y Sampson, P. 2001. Estimación del contenido clorofílico en coberturas con estructura caducifolia y conífera mediante inversión de modelos de transferencia radiativa y datos hiperespectrales. *Rev.* Teledetección, Medio ambiente y Cambio Global (2001) 160-164.