



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**TRABAJO DE TITULACION, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES LONGITUDES DE
ONDA CON LUCES LEDs SOBRE LA RESPUESTA
MORFOGÉNICA Y DESARROLLO EN EXPLANTES DE MORA DE
CASTILLA (*Rubus glaucus* Benth) *IN VITRO*”**

AUTOR: MOYA CAZA, CARLA LILIANA

DIRECTOR: ING. LANDÁZURI ABARCA, PABLO ANÍBAL, MSc.

SANGOLQUÍ

2019



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERIA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, *“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA CON LUCES LEDs SOBRE LA RESPUESTA MORFOGÉNICA Y DESARROLLO EN EXPLANTES DE MORA DE CASTILLA (Rubus glaucus Benth) IN VITRO”* fue realizado por la señorita *Moya Caza, Carla Liliana* el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 19 de diciembre de 2019


.....
Ing. Pablo Landázuri Abarca
C.C.:1708262348



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERIA AGROPECUARIA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *Moya Caza Carla Liliana*, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: *Evaluación del efecto de diferentes longitudes de onda con luces leds sobre la respuesta morfogénica y desarrollo en explantes de mora de castilla (Rubus glaucus Benth) in vitro* es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas. Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 19 de diciembre de 2019

Una firma manuscrita en tinta azul que parece leer 'Carla Liliana Moya Caza'.

.....
Carla Liliana Moya Caza
C.C.:1716061047



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERIA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN

Yo, Moya Caza Carla Liliana, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: Evaluación del efecto de diferentes longitudes de onda con luces leds sobre la respuesta morfogénica y desarrollo en explantes de mora de castilla (Rubus glaucus Benth) in vitro” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 19 de diciembre de 2019

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Carla Liliana Moya Caza'.

.....
Carla Liliana Moya Caza
C.C.:1716061047

DEDICATORIA

El presente trabajo dedico a Dios quien me ha dado la fortaleza para cumplir esta nueva meta y permitirme compartir con mi familia.

A mis padres Marthita y Carlitos, por su inagotable amor y motivación durante estos años apoyándome en todo momento.

A mi hermana Johannita quien ha sido un ejemplo para mi vida, dándome consejos y sosteniendo mi mano en todo momento, gracias por confiar en mí.

A Luchito (Peluche) mi mejor amigo y novio, eternamente agradecida por tu apoyo incondicional durante este trayecto.

A mis amigos con quienes compartí muchos momentos agradables e historias inolvidables Gaby, Byriton, Doris y Bryan.

A Tammy e Iveth mis hermanas espirituales quienes han sido mujeres de ejemplo y tenacidad, gracias, chicas por estar en todo momento.

Liliana

AGRADECIMIENTO

A la Universidad de las Fuerzas Armadas – E.S.P.E. por permitirme ser parte de esta prestigiosa institución.

A la Carrera de Ingeniera Agropecuaria I.A.S.A. 1 por moldear mi vida profesional con profesores y maestros, dedicados a la enseñanza, por prestarme los espacios de laboratorios para que pueda realizarse esta investigación.

Al Ingeniero Pablito Landázuri, quien ha sido un mentor para mi nueva vida profesional, su paciencia y dedicación, en todo momento a lo largo de este trabajo.

Liliana

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA

CERTIFICADO DEL DIRECTOR.....	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1	Antecedentes	1
1.2	Justificación.....	3
1.3	Objetivos	5
1.3.1	Objetivo General	5
1.3.2	Objetivos específicos.....	5
1.4	Hipótesis.....	5

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1	Mora de castilla (<i>Rubus glaucus</i> Benth) Origen e importancia económica	6
2.1.1	Origen.....	6
2.2	Clasificación Taxonómica.....	7

2.3	Importancia económica	7
2.3.1	Mercado Nacional	7
2.3.2	Mercado Internacional.....	7
2.4	Superficie y Rendimiento del cultivo de Mora	7
2.5	Descripción morfológica	8
2.6	Técnicas de propagación	8
2.6.1	Semillas	8
2.6.2	Acodos.....	9
2.6.3	Estacas	9
2.7	Cultivo de Tejidos vegetales.....	10
2.8	Micropropagación	10
2.9	Etapas de la micropropagación	11
2.9.1	Etapa 1 (establecimiento del cultivo).....	11
2.9.2	Etapa de multiplicación	12
2.9.3	Etapa de enraizamiento	13
2.9.4	Etapa de aclimatación.....	14
2.10	Micropropagación en rosáceas.....	14
2.11	La luz y su importancia sobre las plantas.....	15
2.11.1	Luz.....	15
2.11.2	Importancia de la luz sobre las plantas.....	17
2.11.3	Fitocromos.....	17
2.11.4	Criptocromos.....	18
2.11.5	Fototropinas.....	18
2.11.6	Luz artificial	18
2.11.7	Luces LEDs	19
2.11.8	Diseño y función	19
2.11.9	Emisión de luz y calidad	20
2.12	Crecimiento y floración de las plantas bajo el uso de Luces LEDs	20
2.13	Colores LEDs.....	21

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Ubicación de la Investigación	22
3.1.1	Ubicación Política.....	22
3.1.2	Ubicación Geográfica	22
3.1.3	Condiciones de Laboratorio.....	22
3.2	Materiales.....	23
3.3	Métodos.....	23
3.3.1	Obtención del material vegetal de <i>Rubus glaucus</i> Benth	23
3.4	Diseño experimental.....	30
3.4.1	Tratamientos para comparar	31
3.4.2	Croquis del diseño experimental	32
3.4.3	Análisis estadístico	32

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Etapa de Introducción	33
4.2	Etapa de multiplicación.....	38
4.3	Etapa de enraizamiento y aclimatación.....	41

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1	Conclusiones	47
5.2	Recomendaciones.....	48
5.3	Bibliografía.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	<i>Explantos utilizados en Rosáceas.....</i>	14
Tabla 2	<i>Regiones del espectro electromagnético.....</i>	16
Tabla 3	<i>Características de luces LEDs.....</i>	21
Tabla 4	<i>Luces LEDs con su nomenclatura y número de tratamientos.....</i>	30
Tabla 5	<i>Tabla de Análisis de varianza.....</i>	31
Tabla 6	<i>Promedio ± error experimental de contaminación, fenolización, No. Brotes, longitud de yemas y No. De hojas a los 25 días en microestacas de Rubus glaucus Benth, bajo el efecto de diferentes espectros de luces leds en la etapa de introducción, en la Hacienda el Prado, Sangolquí, Ecuador, 2019. LSD ($\alpha= 0,05$).....</i>	33
Tabla 7	<i>Promedio ± error experimental de supervivencia, altura y número de brotes a los 60 días en la etapa de multiplicación in vitro en explantos de Rubus glaucus Benth, bajo el efecto de diferentes espectros de luces leds en la etapa de introducción en la Hacienda el Prado, Sangolquí, Ecuador, 2019. LSD ($\alpha= 0,05$).....</i>	38
Tabla 8	<i>Promedio ± error experimental de número y longitud de raíces a los 30 días después de la siembra en la etapa de enraizamiento de Rubus glaucus Benth, bajo el efecto de diferentes espectros de luces leds en la etapa de introducción en la Hacienda el Prado, Sangolquí, Ecuador, 2019. LSD ($\alpha= 0,05$).....</i>	41
Tabla 9	<i>Valores de la clorofila A, B y Total en la etapa de enraizamiento en explantes de Rubus glaucus Benth in vitro a los 30 días bajo el efecto de luces LEDs en la Hacienda el Prado, Sangolquí, Ecuador, 2019.....</i>	42

Tabla 10 <i>Promedio \pm error experimental de supervivencia a los 15 días después de la siembra en la etapa de aclimatación de <i>Rubus glucus Benth</i>, bajo el efecto de diferentes espectros de luces LEDs en la etapa de introducción, en la Hacienda El Prado, Sangolquí, Ecuador, 2019. LSD ($\alpha= 0,05$).....</i>	44
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Micropropagación Vegetal	11
Figura 2	Luz solar y sus diferentes longitudes de onda.	17
Figura 3	Fitocromos.	18
Figura 4	Ubicación satelital I.A.S.A- Laboratorio.	23
Figura 5	Planta donadora <i>Rubus glaucus</i> Benth (Invernadero de Fruticultura I.A.S.A. 1).	24
Figura 6	Proceso de cambio de etapa de introducción a multiplicación in vitro de <i>Rubus glaucus</i> Benth. a. Microestaca en fase de introducción, b. Microestaca con brote desarrollado y c. Explante en medio de multiplicación.	27
Figura 7	Procedimiento de extracción de clorofila de <i>Rubus glaucus</i> Benth en la etapa de enraizamiento bajo el efecto de luces LEDs. a. pesaje de muestras, b. extracción de clorofila y c. lectura en espectrofotómetro.	29
Figura 8	Aclimatación de <i>Rubus glaucus</i> Benth.	30
Figura 9	Plántulas de <i>Rubus glaucus</i> Benth a los 25 días después de la siembra, bajo el efecto de Luces LEDs a. Azul ($18,3 \mu\text{mol/m. s}^2$); b. Rojo ($5,5 \mu\text{mol/m. s}^2$); c. Verde ($9,2 \mu\text{mol/m. s}^2$); d. Rojo- Azul ($20,1 \mu\text{mol/m. s}^2$); e. Azul- Verde ($12,8 \mu\text{mol/m. s}^2$); f. Rojo- Verde ($22,0 \mu\text{mol/m. s}^2$); g. Azul- Rojo- Verde ($25,6 \mu\text{mol/m. s}^2$) y h. Luz Fluorescente Control Blanco ($14,6 \mu\text{mol/m. s}^2$).	37
Figura 10	Plántulas de <i>Rubus glaucus</i> Benth a los 60 días después de la siembra, etapa de multiplicación in vitro bajo el efecto de Luces LEDs a. Azul ($18,3 \mu\text{mol/m. s}^2$); b. Rojo ($5,5 \mu\text{mol/m. s}^2$); c. Verde ($9,2 \mu\text{mol/m. s}^2$); d. Rojo- Azul ($20,1 \mu\text{mol/m. s}^2$); e. Azul- Verde ($12,8 \mu\text{mol/m. s}^2$); f. Rojo- Verde ($22,0 \mu\text{mol/m. s}^2$); g. Azul-	

	Rojo- Verde (25,6 $\mu\text{mol/m. s}^2$) y h. Luz Fluorescente Control Blanco (14,6 $\mu\text{mol/m. s}^2$).....	40
Figura 11	Correlación entre clorofila A, B, Total y Luz PAR de <i>Rubus glaucus</i> Benth en la etapa de enraizamiento in vitro bajo el efecto de luces LEDs.....	43
Figura 12	Plántulas de <i>Rubus glaucus</i> Benth a los 30 días después de la siembra, etapa de enraizamiento in vitro bajo el efecto de Luces LEDs a. Azul (18,3 $\mu\text{mol/m. s}^2$); b. Rojo (5,5 $\mu\text{mol/m. s}^2$); c. Verde (9,2 $\mu\text{mol/m. s}^2$); d. Rojo- Azul (20,1 $\mu\text{mol/m. s}^2$); e. Azul- Verde (12,8 $\mu\text{mol/m. s}^2$); f. Rojo- Verde (22,0 $\mu\text{mol/m. s}^2$); g. Azul- Rojo- Verde (25,6 $\mu\text{mol/m. s}^2$) y h. Luz Fluorescente Control Blanco (14,6 $\mu\text{mol/m. s}^2$).	44

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar diferentes longitudes de onda utilizando como fuente luces LEDs, basadas en ocho tratamientos T0: Control Blanco fluorescente ($14,6 \mu\text{mol/m. s}^2$); T1= Azul ($18,3 \mu\text{mol/m. s}^2$); T2= Rojo($5,5 \mu\text{mol/m. s}^2$); T3:Verde($9,2 \mu\text{mol/m. s}^2$); T4=Azul-Rojo($20,1 \mu\text{mol/m. s}^2$); T5:Azul-Verde($12,8 \mu\text{mol/m. s}^2$); T6:Rojo- Verde($22,0 \mu\text{mol/m. s}^2$) y T7: Azul-Rojo-Verde($25,6 \mu\text{mol/m. s}^2$) sobre la respuesta morfogénica y desarrollo en explantes de mora de castilla *Rubus glaucus* Benth en condiciones *in vitro*, se utilizó un tratamiento D.C.A. con 4 repeticiones donde se evaluó: la etapa de introducción, multiplicación, enraizamiento y aclimatación. En la etapa de introducción, la longitud de yema el tratamiento luz LED Verde con un 4,48 cm ($p<0,001$), el número de hojas la combinación de luz LEDs Azul- Rojo- Verde con 4 hojas por explante ($p=0,05$). En la etapa de multiplicación, la supervivencia, el número de brotes y la altura del explante tuvieron diferencias significativas ($p<0,001$) con la combinación luz LEDs Rojo-Verde (83%); Luz LED Azul (2,5 brotes/explante) y luz LED Verde (5,41 cm), respectivamente. En la etapa de enraizamiento, número de raíces el tratamiento Control Blanco Fluorescente (3,08), longitud de raíz el tratamiento Control (17,5 mm), finalmente la etapa de aclimatación el número de hojas con la combinación luz LEDs Azul- Rojo- Verde (10). Concluyendo que la calidad de la luz y sus diferentes longitudes de onda inciden sobre la morfogénesis de *Rubus glaucus* Benth *in vitro*. Estos factores provocan modificaciones en su morfología y fisiología que determinan su adaptación ambiental.

PALABRAS CLAVES:

- LUZ LED
- MORA DE CASTILLA
- IN VITRO

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate different wavelengths using LED lights as a source, based on eight T0 treatments: Fluorescent White Control (14.6 $\mu\text{mol} / \text{m. S}2$); T1 = Blue (18.3 $\mu\text{mol} / \text{m. S}2$); T2 = Red (5.5 $\mu\text{mol} / \text{m. S}2$); T3: Green (9.2 $\mu\text{mol} / \text{m. S}2$); T4 = Blue-Red (20.1 $\mu\text{mol} / \text{m. S}2$); T5: Blue-Green (12.8 $\mu\text{mol} / \text{m. S}2$); T6: Red-Green (22.0 $\mu\text{mol} / \text{m. S}2$) and T7: Blue-Red-Green (25.6 $\mu\text{mol} / \text{m. S}2$) on the morphogenic response and development in blackberry explants *Rubus glaucus* Benth under in vitro conditions, a DCA treatment was used with 4 repetitions where it was evaluated: the stage of introduction, multiplication, rooting and acclimatization. In the introduction stage, the length of the yolk the Green LED light treatment with 4.48 cm ($p < 0.001$), the number of leaves the combination of Blue-Red-Green LEDs with 4 leaves per explant ($p = 0,05$). In the multiplication stage, survival, the number of shoots and the height of the explant had significant differences ($p < 0.001$) with the combination of Red-Green LEDs (83%); Blue LED light (2.5 shoots / explant) and Green LED light (5.41 cm), respectively. In the rooting stage, number of roots the Control Fluorescent White treatment (3.08), root length the Control treatment (17.5 mm), finally the acclimatization stage the number of leaves with the combination of LED light Blue-Red - Green (10). Concluding that the quality of light and its different wavelengths affect the morphogenesis of *Rubus glaucus* Benth in vitro. These factors cause changes in their morphology and physiology that determine their environmental adaptation.

KEYWORDS:

- LED LIGHT
- MORA DE CASTILLA
- IN VITRO

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Ecuador es un lugar que posee una diversidad de microclimas, especies y variedades agroecológicas. Ante la demanda y seguridad alimentaria que surgen al pasar los años por la creciente población, es necesario contribuir con el intercambio entre tradiciones ancestrales y nuevas tecnologías potenciando la producción en el campo agrícola.

El primer trabajo en morfogénesis *in vitro* en *Rubus glaucus* Benth fue realizado en Colombia por Marulanda, Carvajalino & Vento (2000), estableciendo la técnica de micropropagación en *Rubus glaucus* Benth, evaluando diferentes gelificantes y fitorreguladores de crecimiento como AIA, AG₃ y BAP.

Otros trabajos como los de Sigarroat & Garcia (2012) del mismo país evaluaron la respuesta de un protocolo de desinfección con dos tiempos de exposición $T_1= 5$ min y $T_2= 10$ min, evaluando dos medios de cultivo M₁(6 Bencilaminopurina 6BAP 2,0 mg/L, Acido giberélico GA₃ 1,0 mg/L) y M₂ (6BAP 2,5 mg/L GA₃ 0,03 mg/L) en *Rubus glaucus* variedad sin espina, donde ambos tratamientos de desinfección resultaron efectivos y M₁ obtuvo el mayor prendimiento.

En Ecuador, se ha reportado un trabajo por Vaca & Landázuri (2013) en *Rubus glaucus* Benth *in vitro*, evaluando dosis de fitoreguladores (BAP y AIA) y tres concentraciones de nitrógeno en el medio Murashige y Skoog (MS), en las fases de multiplicación, enraizamiento y adaptación al sustrato, obteniendo un mayor número de raíces y un alto porcentaje de

enraizamiento con 4,8 mM de nitrógeno; así como menores niveles de estrés en la actividad del fotosistema II y mayor porcentaje de clorofila.

Del mismo modo en el Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Facultad de Ciencias Agropecuarias I.A.S.A 1, de la Universidad de las Fuerzas Armadas – E.S.P.E, se han realizado estudios *in vitro* como los de Vaca en 2008, donde realiza una interacción de reguladores de crecimiento BAP, IBA y AIA en babaco, para el incremento de brotes en cultivo *in vitro*, siendo la fuente vegetal basal la que proporciona mayor número de brotes en combinación con auxinas.

Más tarde, en Rosáceas los trabajos de Narvaez (2009) y Paucar (2011) en rosa variedad Akito y mora respectivamente, se desarrollaron sistemas de regeneración directa en hojas y en medios específicos de cultivo, para cada especie, demostrando mediante pruebas histológicas la formación directa del meristemo, sin pasar por la fase de callogenesis.

Alulema (2013) realizó un trabajo sobre regeneración indirecta, evaluando diferentes concentraciones de auxinas, citoquininas y giberelinas, para obtener proembriones a partir de callos de vitroplantas de *Rubus glaucus* Benth.

Otros trabajos recientes en *Rubus glaucus* Benth *in vitro*, como el desarrollado por Páramo (2018), quien investigó el uso de nanoplata en cinco diferentes dosis, para disminuir la contaminación del medio de cultivo en la micropropagación de *Rubus glaucus* Benth, en sus diferentes fases; demostrando que las dosis de 0,75 mg.l⁻¹ inhibió el crecimiento de microorganismos que provocaban la contaminación. Otro efecto positivo, fue la disminución de la producción de fenoles propios de la planta.

Se conoce que las plantas *in vitro* son semiautotóxicas y para realizar la fotosíntesis, normalmente en Ecuador los laboratorios utilizan luz blanca; sin embargo en los últimos años en

otros países, están aplicando tecnología LED con diferentes longitudes de onda como el rojo y azul en la micropropagación, como lo demuestra el trabajo de (Duong, Takamura, Watanabe, Okamoto, & Tanaka, 2003) en plántulas de fresa, quienes alcanzaron una mayor aclimatación en suelo con respecto a la luz tradicional.

En México se realizó la investigación del uso lumínico en plántulas de brócoli, utilizando LEDs rojos (600- 650 nm), azules (450- 500 nm) y verdes (490- 540 nm) obteniendo una mayor velocidad en la germinación y crecimiento de las plantas (Paniagua, y otros, 2015).

En Ecuador, también se han realizado trabajos recientes como los de (Pachacama, 2018) en *Ghysophila paniculata* y *Trachelium* sp., evaluando tres espectros de luces LEDs: blanca, Far red, y Red White, obteniendo mayor número de brotes, peso de la raíz y contenido de clorofila.

Los beneficios potenciales del LED para la industria agrícola de ambiente controlado son numerosos y se necesita hacer más trabajos para posicionar a la agricultura en la vanguardia de esta tecnología prometedora (Hye & Wheeler, 2008), cabe resaltar que esta investigación es la primera que se realizara en *Rubus glaucus* Benth *in vitro* con luces LEDs.

1.2 Justificación

En el Ecuador la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) presenta un incremento en la demanda del consumo, por esta razón en nuestro país hay aproximadamente 5 000 hectáreas, con rendimientos anuales de 5 T x ha^{-1} ; que provienen principalmente de la técnica de propagación: acodos y estacas. Lamentablemente la calidad y la baja tecnología no garantizan la cantidad ni la sanidad adecuada de la planta para el inicio adecuado del cultivo, lo que promueve la realización de investigaciones que involucren el desarrollo de programas que apoyen a los productores y motiven al crecimiento agroindustrial (INIAP, 2017).

Otros problemas que presenta la reproducción por acodos es la alta demanda de mano de obra, puesto que no se adapta a técnicas mecanizadas de propagación, los factores que hacen más vulnerable a este cultivo son: la nutrición y condiciones ambientales que afectan a su estado fisiológico. Por otro lado, la reproducción por estacas se ve limitada en la variabilidad genética por las plantas madre y una alta probabilidad en transmisión de enfermedades, principalmente de aquellas que son producidas por virus.

La técnica de micropropagación en *Rubus glaucus* Benth ya es una tecnología viable para incrementar el desarrollo de programas de propagación que contribuyan a la calidad de las plántulas en el campo. Esta tecnología se ha ido extendiendo a través de los años, logrando un incremento de especies explotadas por el hombre, ya que está sometido al control de factores. Dentro de las ventajas del uso de esta técnica es el obtener un incremento masivo de plantas en un reducido tiempo y controlando la sanidad del material vegetativo (Villalobos & Thorpe, 1991).

En la actualidad, los laboratorios de investigación y de producción, utilizan iluminación artificial, principalmente luces fluorescentes, para el desarrollo y crecimiento de plantas *in vitro*; sin embargo, estas fuentes de luz son costosas y de baja durabilidad, provocando residuos tóxicos al finalizar su uso; por otra parte, la adaptación completa de las plantas al suelo puede verse afectada, ya que al no recibir la composición, dirección y duración de la luz optima durante su inicio, incide en bajo crecimiento y desarrollo de los explantes en su fotoperiodo (Martínez, Azpíroz, Rodríguez, Cetina, & Gutirrés, 2005).

Últimamente los tubos fluorescentes están siendo reemplazados por nuevas tecnologías lumínicas, en las cámaras de propagación *in vitro*, principalmente por luces LED (Tamayo, 2014). Este estudio está enfocado en la aplicación de LEDs, por la disponibilidad en el mercado

con diferentes longitudes de onda y de esta manera se puede optimizar su rango y espectro lumínico que afectan a la morfogénesis del cultivo *in vitro* *Rubus glaucus* Benth.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto de diferentes longitudes de onda con luces LEDs sobre la respuesta morfogénica y desarrollo en explantes de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) *in vitro*.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la combinación de diferentes longitudes de onda con luces LEDs sobre la etapa 1 (introducción) *in vitro* en microestacas de *Rubus glaucus* Benth para promover su morfogénesis.
- Establecer la tasa de multiplicación *in vitro* en plantas de *Rubus glaucus* Benth mediante la combinación de luces LEDs, para incrementar el número de brotes.
- Determinar el porcentaje de enraizamiento *in vitro* y aclimatación de plantas *Rubus glaucus* Benth con la combinación de luces LEDs, con el fin de incrementar la supervivencia de plantas en el campo.

1.4 Hipótesis

H₀: El efecto de la combinación de longitud de onda con luces LEDs no intervienen en las fases de micropropagación *in vitro* de *Rubus glaucus* Benth.

H_a: El efecto de la combinación de longitud de onda con luces LEDs intervienen en las fases de micropropagación *in vitro* de *Rubus glaucus* Benth.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) Origen e importancia económica.

2.1.1 Origen

Rubus glaucus Benth o mora de castilla pertenece al género *Rubus* la cual está distribuida en todo el mundo con aproximadamente 750 especies, los primeros reportes de los colonizadores españoles que inspeccionaron América dan a conocer la existencia de plantas de zarzamoras con frutos mucho más grandes en comparación con las existentes en Europa (Espinosa, Ligarreto, Barrero, & Medina, 2016).

La mora de castilla es un frutal andino perteneciente a la familia de las rosáceas, en nuestro país se reporta alrededor de 20 especies que corresponden al género *Rubus*. La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) es una especie frutícola nativa de climas correspondientes a la cordillera de los andes ecuatorianos con mayor predominancia en Tungurahua, Cotopaxi, Bolívar, Pichincha e Imbabura (Martínez, Vásquez, Viteri, Jácome, & Ayala, 2013) .

En Colombia se la conoce como “mora de los Andes”, en Perú como “mora azul” y en E.E.U.U. como “BlackBerry”, presentando una alta demanda por los caracteres suculentos y apetecibles que causan sus frutos (Hernández, Lopera, Mora, & Cárdenas, 1999).

2.2 Clasificación Taxonómica

Pertenece a la familia *Rosaceae*, género *Rubus*, especie *glaucus* y variedad Benth (Fuentes & Lligüín, 2015).

2.3 Importancia económica

2.3.1 Mercado Nacional

La situación económica de nuestro país depende en gran medida de productos agrícolas, tanto en su producción como comercialización, el cultivo de mora posee un gran potencial puesto que es consumido casi a diario por familias ecuatorianas y tiene una alta demanda por la región costa. Estudios han demostrado que la provincia de Chimborazo alcanza un consumo del 92% de esta fruta, la mayoría de los hogares riobambeños consumen al menos 1 kg. semana⁻¹ (Romero, Castillo, & Luis, 2017).

2.3.2 Mercado Internacional

En estos últimos años ha tomado un auge las exportaciones de productos ecuatorianos no tradicionales a mercados internacionales mediante las relaciones diplomáticas con China, lo que ha hecho posible que la pulpa congelada de mora para exportar sea una realidad, aunque esto es bueno para nuestra economía aún la demanda de esta fruta está catalogada como insatisfecha tanto en el consumo local como en el exterior (Velástegui, Proaño, & Zurita, 2017).

2.4 Superficie y Rendimiento del cultivo de Mora

Aproximadamente en el Ecuador se estima una superficie de 5 247 ha de mora, cultivada en su mayoría por pequeños productores (Martínez, Vásquez, Viteri, Jácome, & Ayala, 2013)

A una altitud < a 2 100 m.s.n.m hasta 3 000 m.s.n.m, se producen entre 12 – 14 t por año en conjunto las provincias de Tungurahua, Cotopaxi, Pichincha, Imbabura, Carchi y Bolívar (Jácome, 2010).

Actualmente existen datos agropecuarios sobre la producción permanente de fruta fresca de mora de castilla en nuestro país con un rendimiento mínimo de 10 q. ha⁻¹, máximo de 528 q. ha⁻¹ y con un promedio anual de 269 q. ha⁻¹ (ESPAC , 2018).

2.5 Descripción morfológica

La mora de castilla es un arbusto que posee: tallos de forma cilíndrica, cuyo diámetro varía entre 0,7 y 1,4 (mm); yemas que son de color verde- café que aparecen de 40 a 50 yemas por ramas; las hojas son trifoliadas con un largo de 10,9 – 15 (cm) y de ancho 3,3- 6,5 (cm) su color en el haz es verde oscuro y el color del envés es verde claro; su tipo de inflorescencia es en corimbos su flor es compuesta con su cáliz verde pardo la forma del pétalo es lanceolado y el color del estambre es verde; el tipo de fruto es agregado- polidrupa de forma redondeada con un color morado oscuro; el número de semillas por fruto va de 102- 110 (Martínez, Vásquez, Viteri, Jácome, & Ayala, 2013).

2.6 Técnicas de propagación

Tradicionalmente la mora de castilla se reproduce de forma sexual mediante el uso de semillas y asexual por: acodos y estacas (Hernández, Lopera, Mora, & Cárdenas, 1999).

2.6.1 Semillas

La germinación es muy lenta al igual que su desarrollo, por lo cual es considerada una semilla ortodoxa, es decir las semillas poseen latencia exógena y endógena (Díaz, 2011).

2.6.2 Acodos

Para este método de producción se selecciona ramas de la planta que se encuentre en buen estado y sus características fenotípicas sean las indicadas para la propagación, estas son establecidas en el suelo, es importante que la rama no sea desprendida es decir las ramas están fijadas a la planta donadora, donde serán cubiertas alrededor de 25 cm con el suelo, las cuales deben ser sostenidas por estacas, con lo que se obtiene alrededor de tres a cuatro acodos por rama, posteriormente nacen raíces, a los 30 días se separa de la planta madre y a los tres meses se obtienen las nuevas plantas (Lligüín, 2015).

Uno de los problemas que se presenta en el uso de esta técnica es la pérdida de la dominancia apical, comprobando cambios fisiológicos notables como la decoloración del tallo en la zona cubierta por el suelo o sustrato y aparición de raíces laterales (Franco, Rodríguez, & Guevara, 2000).

2.6.3 Estacas

Esta técnica se basa en obtener tallos de aproximadamente 35 cm, de una planta donadora con buenas características fisiológicas, los diámetros de los tallos deben ser de alrededor de 1 cm o mínimo del grosor de un lápiz, además deben poseer entre 3- 4 yemas, por lo general se utiliza ramas semileñosas o leñosas es decir aquellas que ya hayan experimentado una etapa de producción, las ramas juveniles no logran responder a esta técnica representando un bajo rendimiento, para su siembra se realiza directamente a fundas con sustratos adecuados y la interacción de hormonas de enraizamiento para su desarrollo, dependerá mucho el control de los factores ambientales para obtener plantas en un periodo de cuatro a seis meses (Lligüín, 2015).

Aunque el material es abundante y los procedimientos son poco costosos no es recomendable este tipo de producción por la tasa baja de prendimiento y potenciales inconvenientes con enfermedades fúngicas (Gárate, 2010).

2.7 Cultivo de Tejidos vegetales

Es un método alternativo ante las técnicas convencionales de producción vegetal, también conocido como “cultivo *in vitro* de plantas”, por desarrollarse en materiales de vidrio, aunque en la actualidad se utilicen otros materiales, dentro de estos se utiliza un medio artificial ya sea este sólido o líquido, es una tecnología que involucra células con alto grado de diferenciación (Patiño, 2012).

Los primeros estudios en los que se implementó esta técnica fueron reportados en el año 1902, pero el primer caso exitoso ocurre 32 años después donde se usó raíces de tomate y en el medio nutritivo se aplicó extracto de levadura, cabe recalcar que estos órganos pueden producir metabolitos secundarios que sobrepasan a la producción de una planta, es decir que con esta aplicación se puede extraer mayor cantidad de metabolitos que serán utilizados para la aplicación de actividades terapéuticas (Rodríguez, 2018).

2.8 Micropropagación

Es una técnica de propagación muy utilizada para la producción de individuos libres de patógenos y características específicas para el ámbito económico, ya que se produce plantas de calidad uniforme para la demanda comercial, las ventajas es que este cultivo puede realizarse en espacios pequeños, donde se controla el ambiente en el que se va a desarrollar las plantas, por lo que es independiente de las estaciones de año y variación de climas (Malajovich & Soares, 2004).

Se la conoce también como propagación clonal por cultivo *in vitro* utilizada para la difusión masiva de plantas como: frutales, ornamentales, forestales, hortícolas, etc. Este método biotecnológico permite cultivar células, tejidos, órganos, embriones, de una forma más rápida que controla medios específicos y condiciones ambientales (Segretín, 2006)

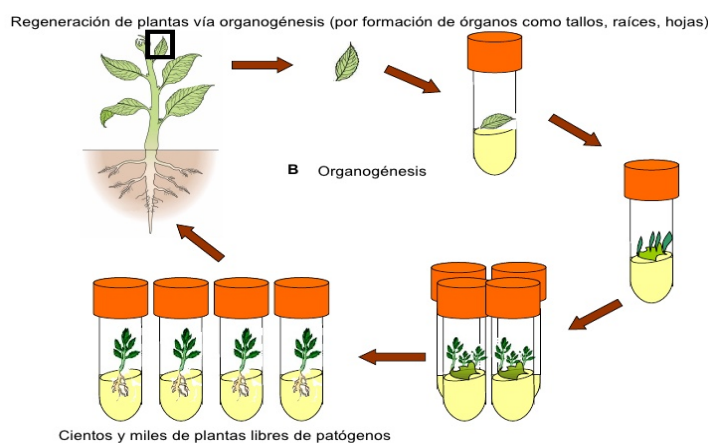


Figura 1. Micropropagación Vegetal
Fuente: (Tofiño, 2017)

2.9 Etapas de la micropropagación

2.9.1 Etapa 1 (establecimiento del cultivo)

Esta etapa también se la conoce como Introducción, en la cual se realiza procesos de selección, preparación, aislamiento y esterilización de los explantes.

Se ha demostrado que los tejidos meristemáticos juveniles tienen la facultad de una regeneración rápida, como lo son las yemas axilares y adventicias, semillas o embriones de las plantas herbáceas, sin embargo, los explantes además pueden ser trozos de hojas, porciones de raíz, etc. En esta etapa se puede realizar un análisis a las plantas donadoras a modo de prevención, para tener una pronta detección de patógenos y de esta forma controlar con técnicas

adecuadas utilizando: antibióticos, antivirales o una previa fumigación en el invernadero de donde procede el material vegetativo.

Se continua con una desinfección superficial mediante el uso de: alcohol al 70% por 1 minuto, seguido de concentraciones de 0,5 hasta 1,5 % (cloro activo) de Hipoclorito de sodio, unas gotas de yodo y el uso de fungicidas de acuerdo con el cultivo que se va a utilizar.

Muchas veces quedan patógenos latentes aun después de la desinfección superficial, es así como estos aparecen posteriormente y son identificados mediante la observación de infecciones por bacterias u hongos, debido a que lograron sobrevivir dentro del sistema vascular, este tipo de patógenos pueden ser controlados en el medio de cultivo con el empleo de bacteriostáticos o antibióticos (Olmos, Luciani, & Galdeano, 2016).

2.9.2 Etapa de multiplicación

El objetivo de esta etapa es aumentar el número de brotes por explante, para mantener una fidelidad genética se recurre a la utilización de meristemas o yemas ya existentes, esta etapa dependerá mucho de los promotores de crecimiento que se utilice y sus concentraciones, por ello las citoquininas son las seleccionadas para promover el desarrollo de los brotes, inhibiendo la dominancia apical del explante (Cano, 2013).

Para poder obtener los mejores resultados se debe interactuar tres factores: el estado del material vegetativo, la preparación del medio de cultivo con el recipiente donde se encuentra el explante y las condiciones ambientales externas del cuarto de propagación.

Uno de los problemas que presentan los explantes en esta fase es la oxidación de los compuestos fenólicos, debido a respuestas de estrés ocasionadas por la manipulación y daño mecánico, estos compuestos llegan a inhibir el crecimiento y desarrollo del explante e inclusive su muerte. Para ello es recomendable reducir este impacto con el uso de agentes que absorben fenoles, como el carbón activado o antioxidantes como el ácido ascórbico en el medio de cultivo (Olmos, Luciani, & Galdeano, 2016).

2.9.3 Etapa de enraizamiento

En la fase de multiplicación predomina el uso de citoquininas para la producción de brotes, por lo tanto, hay una inhibición del crecimiento y formación de raíces, mientras que en la fase de enraizamiento se aumenta la utilización de auxinas para la producción de raíces adventicias (Cano, 2013).

Esta etapa se la puede realizar *in vitro* o *ex situ*, para ello se utilizan explantes que provengan de la etapa de multiplicación con 4 o 5 yemas, es importante recalcar el uso de auxinas en los vástagos antes de entrar a la fase de enraizamiento con concentraciones de 1-10 uM, durante pocas horas. Finalmente, los vástagos serán transferidos al medio basal sin promotores de crecimiento que le permitirá el desarrollo de las raíces.

La formación de raíces adventicias en especies leñosas suele ser más complejo puesto que tiene una restringida capacidad rizogénica a diferencia de las especies herbáceas (Olmos, Luciani, & Galdeano, 2016).

2.9.4 Etapa de aclimatación

La aclimatación es la etapa que concluye el proceso de micropropagación, el éxito o el fracaso depende de la adaptación y la tasa de supervivencia de las plantas, por ello es conveniente la utilización de cámaras de crecimiento adecuadas (Castillo, 2004).

En esta etapa es importante el control de factores como la temperatura y humedad relativa de manera moderada, logrando una adaptación progresiva (Olmos, Luciani, & Galdeano, 2016).MEI

Existen dos principios para tener en cuenta en la aclimatación y son el estrés hídrico y la adaptación nutricional – fotosintética, los cuales se deben manejar de una manera equilibrada, manteniendo las condiciones ambientales controladas dentro del invernadero o cámara de crecimiento, una vez adaptadas serán transferidas a condiciones naturales (Cano, 2013).

2.10 Micropropagación en rosáceas

Tabla 1

Explantes utilizados en Rosáceas

Técnica	Cultivar	Explante sembrado
	Rosáceas en general	Yemas
Micropropagación	Mora	Yemas apicales
	Mora	Entrenudos
	Mora	Yemas axilares

Fuente:(Hernández, Lopera, Mora, & Cárdenas, 1999)

2.11 La luz y su importancia sobre las plantas.

2.11.1 Luz

Es una radiación electromagnética, en concreto la luz es energía y el fenómeno de color es el resultado de la interacción entre energía y materia, esta puede ser irradiada a partir de una fuente y esta puede ser de una lámpara, el sol, flash, etc. Posee ondas electromagnéticas transversales, por lo que se puede trasladar a grandes velocidades de aproximadamente 300.000 km/s y traspasando sustancias transparentes (García, 2007).

La luz es un factor indispensable que brinda energía para el crecimiento y desarrollo de una planta siendo el canal principal para la fotosíntesis, ya que captura la luz solar para fabricar su alimento (Paniagua, y otros, 2015).

Influye en muchos procesos fisiológicos, la intensidad y el ambiente lumínico es un componente fundamental para la regeneración de plantas, existen cuatro características principales de la radiación solar: intensidad, el espectro, la direccionalidad, y la distribución en tiempo – espacio (Valladares, Aranda, & Sánchez, 2004).

Diferentes colores componen la luz solar así también diferentes longitudes de onda, para el ojo humano se percibe entre 400 – 700 nanómetros mientras que para las plantas llegan a percibir los rayos UV (ultravioleta) hasta el rojo lejano.

Así se tiene la siguiente composición:

Tabla 2
Regiones del espectro electromagnético

Color	Longitud de onda representativa (nm)	Energía (kJ/mol)
Ultravioleta	254	471
Violeta	410	292
Azul	460	260
Verde	520	230
Amarillo	570	210
Anaranjado	620	193
Rojo	680	176
Infrarrojo	1400	85

Fuente: (Almansa, 2011)

- a) Receptores de luz uv – B (280 – 320 nm).
- b) Criptocromos que absorben luz uv- A (320 -390 nm).
- c) Clorofilas que absorben luz roja y azul (600-700 nm).
- d) Carotenoides que absorben luz verde y amarilla (400- 600 nm).
- e) Fitocromos que absorben luz roja y roja lejana (700- 800 nm).

La radiación es una fuente de poder ya que se encuentra en el núcleo del sol, donde se producen reacciones que liberan energía que es emitida a todo el universo y solo una fracción pequeña incide en nuestro planeta, esta radiación es conocida como constante solar la mayor parte es absorbida por la atmosfera. Los espectros mencionados anteriormente en la tabla 2 son absorbidos por la biosfera (Meisel, Urbina, & Pinto, 2011).

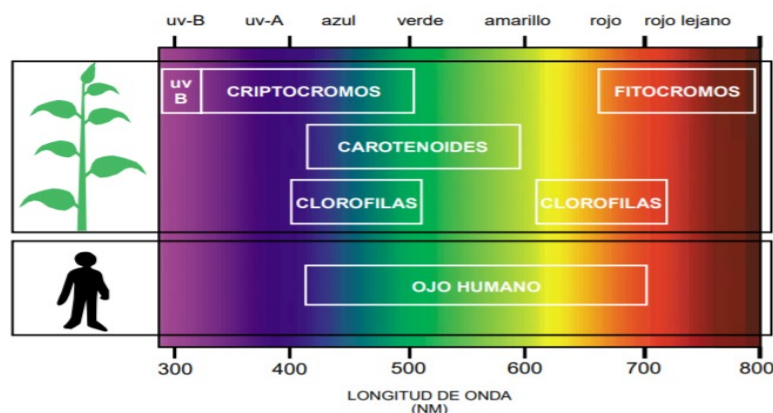


Figura 2 Luz solar y sus diferentes longitudes de onda
Fuente. (Martínez, Monte, & Ruiz, 2002)

2.11.2 Importancia de la luz sobre las plantas

La radiación solar es indispensable para el desarrollo de los cultivos ya que esta al combinar la intensidad y el color de la luz activan a los fotorreceptores: fitocromos, criptocromos y fototropinas, con longitudes de ondas específicas (Fuentes & Lligüín, 2015).

2.11.3 Fitocromos

Fueron descubiertos en los años cincuenta por medio de una investigación en semillas de lechuga y observaron que ni el 20 % lograba una germinación en oscuridad, mientras que a una radiación con luz roja se obtenía la máxima cantidad de germinación por lo que se dio a conocer que los fitocromos son pigmentos vegetales que dominan distintas características del desarrollo de la planta a través de la información de los cambios de su ambiente promoviendo su crecimiento (Martínez, Monte, & Ruiz, 2002).

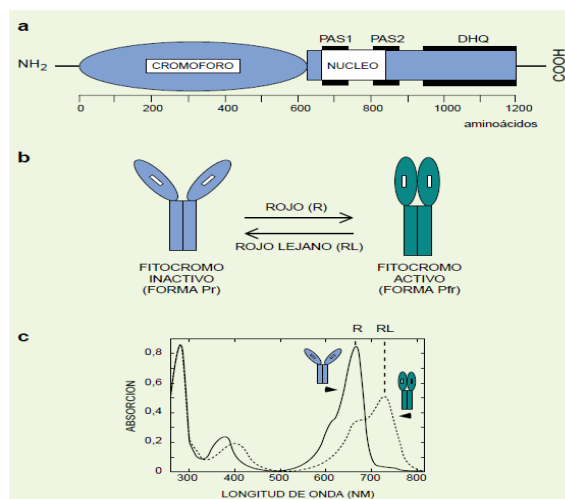


Figura 3 Fitocromos

Fuente. (Martínez, Monte, & Ruiz, 2002)

2.11.4 Criptocromos

Es el responsable de inhibir el alargamiento del hipocótilo y la apertura de los cotiledones tiene una respuesta alta a la intensidad de luz azul, participa en la inducción de antocianinas existen criptocromo 1 y criptocromo 2 (Mazzella, 2001).

2.11.5 Fototropinas

Pertenecen a la familia Flavoproteínas actúa como fotorreceptores de la luz uv-A /azul generando cambios en el crecimiento de la planta donde participa la fitohormona auxina (Meisel, Urbina, & Pinto, 2011).

2.11.6 Luz artificial

Esta fuente de luz fue diseñada para el desarrollo y crecimiento de plantas cuando hay poca o escasa iluminación natural, o para lugares donde la estación de invierno es demasiado larga, extendiendo los fotoperiodos cuando existe poca luz.

Las lámparas de luz fluorescente blanca han sido muy utilizadas en invernaderos como en laboratorios, pero con el avance de la tecnología, han sido reemplazadas por luces LEDs (Bures, Gavilán, & Kotiranta, 2018).

2.11.7 Luces LEDs

Denominada del idioma inglés (Light Emitting Diode), es la revolución en la actualidad de luminotecnia, por el cuidado medioambiental ya que no emiten residuos de Hg, siendo de bajos costos (Bures, Gavilán, & Kotiranta, 2018).

2.11.8 Diseño y función

El diseño de los LED varía y existen tres tipos estructurales principales, que son cables de plomo, montaje en superficie y LED de alta potencia, los LED funcionan como chips de computadora. Los LED son semiconductores de estado sólido y cuando se encienden o se apagan, la acción es instantánea

En cuanto al tiempo de vida (aproximadamente el 70 % de la instalación inicial), los LED pueden funcionar hasta 50,000 horas. No es necesario reemplazar diodos individuales o lámparas constantemente porque los LED no se queman). En cuanto al consumo de energía, los LED son más eficientes y consumen menos energía que cualquier otra luz de invernadero tradicional. Además, los costos operativos y las emisiones de carbono se reducen cuando se utilizan LED (Saeid, 2017).

2.11.9 Emisión de luz y calidad

Los LED emiten luz blanca y coloreada. Para hacer luz blanca (utilizada para iluminación general), se mezclan varios colores. La mezcla puede incluir una combinación de azul, verde, rojo, ultravioleta (UV) y amarillo. Los colores se convierten a través de un material de fósforo recubierto en LED. Durante el proceso de conversión, el material de fósforo absorbe energía de longitudes de onda cortas (λ) y lo emite en longitudes de onda más largas.

La emisión de luz de los LED es estrecha, reduciendo la contaminación lumínica. Otra gran característica relacionada con la emisión de color de los LED es que la composición se puede crear o ajustar (ajuste de color) para respuestas específicas de plantas. Según el tipo, los LED pueden emitir longitudes de onda entre 250 nm (UV) y 1.000 nm (infrarrojos) o más, lo que se conoce como calidad de luz y está relacionado con la radiación fotosintéticamente activa (PAR).

Las longitudes de onda en el rango de 400 y 700 nm se consideran óptimas para las plantas. La luz azul aumenta la producción de clorofila, dando como resultado un follaje más saludable. La luz roja y roja lejana promueve el crecimiento y la floración, lo cual es útil para las plantas de día largo en condiciones de día corto (Carney, Venetucci, & Gesick, 2016).

2.12 Crecimiento y floración de las plantas bajo el uso de Luces LEDs

Los LED son el tipo de iluminación ideal porque los productores pueden seleccionarlos según la salida espectral. Las plantas de todos los tipos y etapas responden a una longitud de onda específica que mejora su desarrollo, calidad y productividad. Los LEDs que emiten R o FR son los mejores para plantas ornamentales en flor. La emisión de luz azul es ideal para el crecimiento

vegetativo. Las plántulas vegetales y ornamentales (tapones), así como las plantas propagadas (por ejemplo, semillas, esquejes y bulbos) (Saeid, 2017).

2.13 Colores LEDs

- **Rojo:** Percibida por los fitocromos reguladores del síndrome de huida de sombra, los fitocromos absorben tanto la luz roja como la roja lejana, y son los principales reguladores de la respuesta del síndrome de huida de la sombra. (600 – 650 nm).
- **Azul:** percibida por los fotorreceptores permitiendo una transpiración eficiente, las fototropinas median en la regulación estomática y el movimiento de la planta hacia la luz. Los criptocromos regulan muchas respuestas fotomorfogénicas, tales como la inhibición del alargamiento del tallo. (450 – 500 nm).
- **Verde:** percibida por fototropinas y criptocromos, las plantas cultivadas bajo la luz verde tienen pecíolos y entrenudos largos y elevada temperatura en las hojas. (490 – 540 nm).

(Bures, Gavilán, & Kotiranta, 2018).

Son tiras de tiple núcleo (por las tres diferentes áreas que se pueden identificar al mirar de cerca el LED). Cabe destacar que las tiras con SMD5050 ofrecen una intensidad de luz 3 veces mayor (Kywi S.A, 2018).

Tabla 3
Características de luces LEDs

Propiedades	
Tensión nominal	12VDC
Vida estimada(H)	30000
Luminosidad (Lm)	5000
Medidas (mm)	10x5000
Rango de T [°] C	20

Fuente: (Kywi S.A, 2018)

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación de la Investigación

3.1.1 Ubicación Política

Provincia: Pichincha

Cantón: Rumiñahui

Parroquia: San Fernando, Hda. El Prado, IASA I

3.1.2 Ubicación Geográfica

Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias IASA I

Latitud: 0°23'11.16"S

Longitud: 78°25'1.56"O

Altitud: 2748 m.s.n.m

Fuente: Estación Meteorológica I.A.S.A. 1, 2018

3.1.3 Condiciones de Laboratorio

Las temperaturas existentes en el laboratorio son: Promedio=14° C, Máxima=21° C y Mínima=7° C, Con una humedad relativa del 62% (Páramo, 2018).



Figura 4. Ubicación satelital I.A.S.A- Laboratorio
Fuente: (DigitalGlobe, 2019)

3.2 Materiales

Materiales Varios

Jabón líquido, cloro comercial, alcohol, Fungicida, rociadores de agua de 1000 ml, tijeras de podar, tiras de luces LEDs (Rojo, Verde y Azul), estanterías, temporizador digital, cámara fotográfica, papel milimetrado y etiquetas adhesivas.

3.3 Métodos

3.3.1 Obtención del material vegetal de *Rubus glaucus* Benth

El material fue colectado en el invernadero de fruticultura situado en las instalaciones de la Institución I.A.S.A 1, seleccionando a las plantas madre que reunieran las siguientes características: libres de enfermedad, vigor vegetativo, producción de flores y frutos, constante producción de ramas vegetativas y florales. De estas plantas donadoras se seleccionó material vegetativo juvenil (Castillo, 2004).



Figura 5.Planta donadora *Rubus glaucus* Benth
(Invernadero de Fruticultura I.A.S.A. 1)

Etapa I: Establecimiento del cultivo inicial

Preparación del Medio de cultivo

Se utilizó la formulación de Murashige y Skoog (MS), (1962) al 50% de sus sales, suplementado con 15 g de sacarosa, 6g de Agar, reguladores de crecimiento BAP ($0,5 \text{ mg. L}^{-1}$), AG_3 ($0,5 \text{ mg. L}^{-1}$), vitaminas al 100% y la adición de nanoplata (50 mg. L^{-1}); ajustados a un pH de 5,8 posteriormente se esterilizó el medio en la autoclave por un periodo de 15 minutos a 121°C y se dispensó en los envases plásticos de 80 ml (Murashige & Skoog, 1962), (Cancino, García, Villamizar, & Díaz, 2015), (Páramo, 2018).

Una vez seleccionado el material vegetativo se procedió a la desinfección.

Desinfección precámara: las ramas o varetas fueron podadas, para empezar el material vegetativo fue sumergido en agua con jabón líquido neutro, con la ayuda de un cepillo se procedió a limpiar el material, dejándolo en reposo por 10 minutos después se enjuagó con agua destilada, esto se realizó para eliminar microorganismos superficiales, sugerido por (Cañizares, 1998).

Posteriormente, el material vegetativo se sumergió en agua destilada con 2 mg. L⁻¹ de fungicida Benomil durante 10 minutos, más tarde se procedió a enjuagar con agua destilada, durante 30 segundos se sumergió el material vegetativo en alcohol al 70%, esta limpieza es más profunda para evitar contaminación en el cultivo (Zapata, 2014).

Desinfección dentro de Cámara: el material vegetativo fue sumergido en agua destilada estéril con hipoclorito de sodio comercial al 0,8% durante 10 minutos con agitación constante, se realizó 3 enjuagues uno de 5 minutos, otro de 10 minutos y el ultimo de 15 minutos con agua destilada estéril (Vaca, 2012) adaptado en el laboratorio.

Siembra en la cámara de flujo de microestacas en el medio de cultivo

Una vez desinfectado el material se trasladó a un recipiente esterilizado con ácido ascórbico (150 mg. L⁻¹) en 1 litro de agua destilada estéril, se realizó cortes del material vegetativo excluyendo las áreas afectadas o necrosadas, se extrajo las microestacas con yemas, mediante el bisturí. Se procedió a sembrar en el medio de cultivo MS contenido en el envase de plástico el cual fue sellado con film plástico y debidamente etiquetado, colocándolos en sus respectivos tratamientos de luces LEDs con un fotoperiodo de 8 horas luz y 16 de oscuridad.

Mediciones

Etapas I

Porcentaje y presencia de contaminación *in vitro*

El porcentaje de contaminación se evaluó en el número de envases afectados por microorganismos los cuales fueron medidos cada 8 días hasta que culmine la fase de introducción, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de contaminación (Tratamiento)} = \frac{\# \text{ de envases contaminados}}{\# \text{ de envases totales}} \times 100$$

Oxidación fenólica

La evaluación se realizó de manera visual a los 8 y 25 días, después de la siembra en las microestacas, se cuantifico con dos aspectos característicos: La oxidación completa de la microestaca y la liberación de fenoles al medio de cultivo usando la siguiente ponderación de 1-3:

- Baja= <33% (Presencia de fenoles, obscurecimiento en los extremos de la microestaca).
- Media= 66% (Liberación de fenoles con presencia en microestacas y en el medio de cultivo).
- Alta= 99% (Microestaca totalmente necrosada).

Se consideró la ponderación 3 como pérdida de la microestaca.

(Domínguez, y otros, 2016), adaptado en el 2019.

Número de Brotes

El conteo se realizó mediante la observación a través del tiempo y la aparición de los brotes.

Altura del brote y número de hojas

Se extrajo la microestaca con el nuevo brote dentro de la cámara de flujo laminar y se procedió a separar al brote de la microestaca con un corte mediante el bisturí esterilizado, para la medición de la altura del brote se utilizó hojas de papel milimetrado esterilizadas, mientras que para el número de hojas se usó el método de observación y conteo tomando datos de aquellas microestacas a los 25 días después de la siembra.

Etapa II

Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó para la multiplicación fue en base a Murashige y Skoog (MS)(1962) al 50% de sus sales, suplementado con 50 mg. L⁻¹ de nanoplata, 30 g de sacarosa, 6g de agar, vitaminas y fitorreguladores de crecimiento como Bencilaminopurina BAP (1 mg. L⁻¹) y Ácido Indolacético AIA(2 mg. L⁻¹), con un pH de 5,7 se procedió a su esterilización en la autoclave por 15 minutos a 121⁰C y se hizo la dispensación de 10 ml de medio por envase estéril. (Murashige & Skoog, 1962); (Cañizares, 1998); (Páramo, 2018).

Siembra de explantes en el medio de multiplicación

Después de 25 días de la primera fase, se seleccionaron los brotes que se adaptaron al medio de introducción, los cuales se transfirieron al medio de cultivo de multiplicación, con todos los instrumentos esterilizados para evitar muerte o infección del explante.

Posteriormente fueron llevados a los tratamientos de luz LED correspondientes con un fotoperiodo de 8 horas luz y 16 de oscuridad.

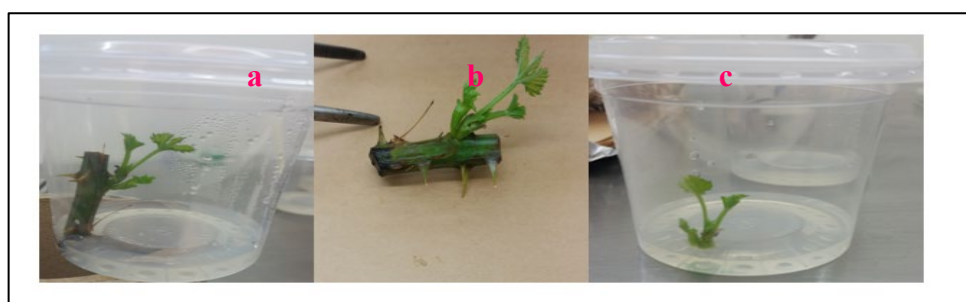


Figura 6. Proceso de cambio de etapa de introducción a multiplicación *in vitro* de *Rubus glaucus* Benth. a. Microestaca en fase de introducción, b. Microestaca con brote desarrollado y c. Explante en medio de multiplicación.

Número de Brotes y altura del explante

El conteo se realizó mediante la observación a través del tiempo y la aparición de los brotes, con la ayuda del estereomicroscopio.

Para la altura de los explantes, primero fueron extraídos del medio de multiplicación dentro de la cámara y para medir su longitud se usó hojas de papel milimetrado esterilizadas.

Etapas III

Preparación del medio de cultivo

Para esta etapa se utilizó un medio MS líquido con los nutrientes y la sacarosa reducidos a la mitad de la concentración original, con una variación de reguladores de crecimiento BAP (0,5 mg. L⁻¹), AIA(0,2 mg. L⁻¹) e IBA (0,5 mg. L⁻¹), el medio fue esterilizado y posteriormente se dispuso en los envases esterilizados (Rojas, García, & Alarcón, 2004).

Siembra de explantes en enraizamiento

Se procedió a transferir los explantes al medio de enraizamiento, realizando cortes enteros con ayuda del bisturí en periodos de tiempo corto, ya que si se extendían más de 1 minuto el explante empezaba a morir. Una vez transferidos se selló el envase, con film plástico junto con la etiqueta correspondiente para cada tratamiento de luz LED, con un fotoperiodo de 8 horas luz y 16 de oscuridad.

Número y longitud de raíces

Pasado los 30 días de esta etapa, se realizó el conteo mediante la observación a través del tiempo y la aparición de las raíces mientras que para la longitud se utilizó una regla graduada y esterilizada.

Extracción de clorofila en la etapa de enraizamiento

Para este procedimiento se aplicó el protocolo con 95% Etanol, en donde se pesó 0,25 g de material vegetal (hojas), seguido de esto se trituro cada muestra en un mortero colocando 2,5ml de alcohol etílico al 95%, el macerado obtenido se dejó reposar por 24 horas en refrigeración.

Al siguiente día se centrifugaron las muestras para luego ser llevadas al espectrofotómetro a 649 y 665 nm y ser leídas (Sumanta, Choudhury, Jaishe, & Roy, 2014).

Se midió mediante espectrofotometría (Abs 664 y 649) y la cantidad de clorofila se obtuvo aplicando las siguientes fórmulas.

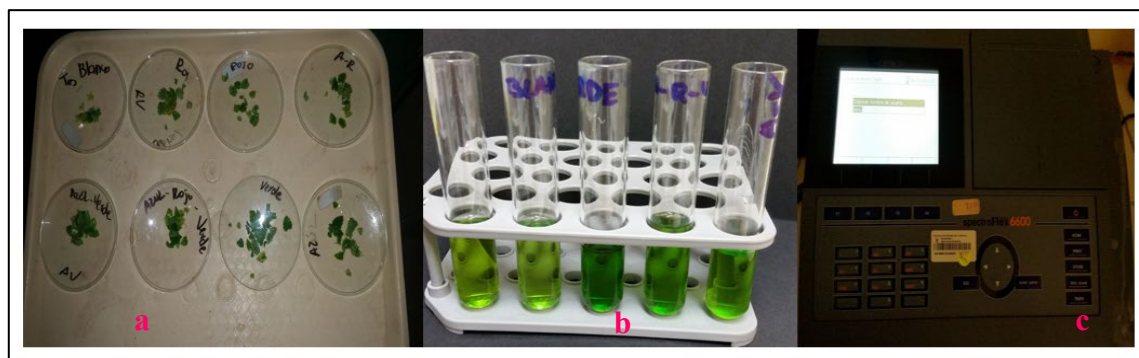


Figura 7. Procedimiento de extracción de clorofila de *Rubus glaucus* Benth en la etapa de enraizamiento bajo el efecto de luces LEDs. a. pesaje de muestras, b. extracción de clorofila y c. lectura en espectrofotómetro

Etapa IV:

En esta etapa se utilizaron tarrinas plásticas con turba negra y de coco, una vez enraizadas las plántulas se colocaron en los recipientes con sustratos, en los tratamientos correspondientes y un fotoperiodo de 8 horas luz.



Figura 8. Aclimatación de *Rubus glaucus* Benth

Porcentaje de supervivencia y Número de hojas

El porcentaje se realizó mediante la observación y conteo de plantas que lograron vivir 8 y 15 días después de la transición. Para el número de hojas se hizo un conteo observacional a los 15 días después de iniciado su cambio de etapa.

3.4 Diseño experimental

Tratamientos Luces LEDs

Para todas las etapas del cultivo *in vitro* de *Rubus glaucus* Benth se utilizó el mismo diseño experimental donde los tratamientos fueron los siguientes: el efecto de 3 luces LEDs y sus combinaciones (Roja, Azul, Verde, Roja-Azul, Roja-Verde, Azul-Verde, Azul-Roja-Verde) y el control luz Fluorescente Blanco.

Tabla 4

Luces LEDs con su nomenclatura y número de tratamientos

Nº de Tratamientos	Descripción/ color Luz led	Nomenclatura Etiqueta
Control	Blanco Fluorescente ($14 \mu\text{mol/m. s}^2$)	TB
T1	Rojo ($5,5 \mu\text{mol/m. s}^2$).	R
T2	Azul ($18,3 \mu\text{mol/m. s}^2$).	A
T3	Verde ($9,2 \mu\text{mol/m. s}^2$).	V
T4	Rojo- Azul ($20,1 \mu\text{mol/m. s}^2$)	RA
T5	Rojo- Verde ($22,0 \mu\text{mol/m. s}^2$)	RV
T6	Verde- Azul ($12,8 \mu\text{mol/m. s}^2$)	VA
T7	Rojo- Azul- Verde ($25,6 \mu\text{mol/m. s}^2$)	RAV

3.4.1 Tratamientos para comparar

Los tratamientos que se compararon son los niveles del factor (Longitudes de onda las plantas *in vitro* de mora de castilla, Control= 250- 370 nm, R=600 – 650 nm, A=450 – 500 nm, V= 490 – 540 nm y sus combinaciones).

Tipo de diseño

El diseño para emplearse es un diseño completamente aleatorizado DCA con siete tratamientos más un control, cada uno con 4 repeticiones con el siguiente modelo matemático:

$$Y_{IJK} = u + Li + +\varepsilon_{ij}$$

Donde:

u: media general

Li: efecto del i-esima luz led

ε_{ij} : error experimental.

Análisis de varianza

Tabla 5

Tabla de Análisis de varianza.

Fuentes de variación	Grados de libertad
Total	31
Luces	7
Error	24

Repeticiones

El número de repeticiones fueron 4 respectivamente para cada condición lumínica.

Características de las UE

La unidad experimental estuvo constituida de 3 frascos de polietileno distribuida en cada una de los 8 tratamientos y 4 repeticiones dando un total 98 frascos y 32 unidades experimentales.

3.4.2 Croquis del diseño experimental

<i>T6</i>	<i>T1</i>	<i>T5</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T2</i>	<i>T7</i>	<i>T4</i>
<i>T5</i>	<i>T2</i>	<i>C</i>	<i>T6</i>	<i>T7</i>	<i>T2</i>	<i>T6</i>	<i>C</i>
<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T7</i>	<i>T5</i>	<i>T1</i>	<i>C</i>	<i>T3</i>	<i>T5</i>
<i>C</i>	<i>T6</i>	<i>T3</i>	<i>T7</i>	<i>T4</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T1</i>

3.4.3 Análisis estadístico

Utilizando el programa informático INFOSTAT y R se realizó en base a una diferencia mínima significativa (DMS), prueba LSD a un nivel de significancia del (0,05 %) para comparar el efecto de las diferentes longitudes de onda con luces LEDs.

En caso de no cumplirse los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se realizó un análisis de modelos lineales generalizados, para determinar el efecto de luces LEDs sobre las variables a medir, utilizando un modelo D.C.A. y se realizaron pruebas de comparación de medias con LSD Fisher al 5% de significancia.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Etapa de Introducción

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos de: contaminación, fenolización, número de brotes, longitud de yema y número de hojas.

Tabla 6

Promedio ± error experimental de contaminación, fenolización, No. Brotes, longitud de yemas y No. De hojas a los 25 días en microestacas de Rubus glaucus Benth, bajo el efecto de diferentes espectros de luces leds en la etapa de introducción, en la Hacienda el Prado, Sangolquí, Ecuador, 2019. LSD ($\alpha = 0,05$).

Tratamiento	Contaminación	Fenolización	N.B.	L.Y. (cm)	N.H			
	n.s	**	n.s	**	*			
Azul	0.08±0,12	33±4,31	b	1±0,31	1.33±0,09	d	1.5±0,61	b
Rojo	0.25±0,12	33±3,71	b	1.17±0,29	2.08±0,09	b	2.67±0,56	b
Verde	0.17±0,12	33±0,01	b	1±0,29	4.48±0,09	a	2.25±0,47	b
Azul-Verde	0.08±0,11	33±0,01	b	1±0,33	1.08±0,09	d	1.5±0,53	b
Azul-Rojo	0.08±0,08	33±0,01	b	1±0,33	1.71±0,09	c	3.45±0,43	a
Rojo-Verde	0.08±0,08	33±0,01	b	1±0,29	2.23±0,09	b	2.56±0,5	b
Azul-Rojo-Verde	0.17±0,08	39±0,01	a	1±0,3	1.33±0,09	d	4.09±0,35	a
Control	0.25±0,08	41±0,01	a	1±0,3	1.33±0,09	d	2.22±0,35	b

N.B., número de brotes; L.Y., longitud de yema; N.H., número de hojas; n.s, no significante; *, significante $p \leq 0,05$; **, significante $p \leq 0,01$; Luces LEDs: Rojo ($5,5 \mu\text{mol/m. s}^2$); Azul ($18,3 \mu\text{mol/m. s}^2$); Verde ($9,2 \mu\text{mol/m. s}^2$); Rojo- Azul ($20,1 \mu\text{mol/m. s}^2$); Azul- Verde ($12,8 \mu\text{mol/m. s}^2$); Rojo- Verde ($22,0 \mu\text{mol/m. s}^2$); Azul- Rojo- Verde ($25,6 \mu\text{mol/m. s}^2$); Luz Fluorescente Control Blanco ($14,6 \mu\text{mol/m. s}^2$).

Respecto al índice de contaminación (Tabla 6) en el medio de cultivo de microestacas *Rubus glaucus* Benth, bajo el efecto de diferentes luces LEDs a los 25 días después de la siembra, las cuales no presentaron diferencias significativas ($F = 0,49$; $p = 0,8402$) entre tratamientos.

La variable evaluada presentó un rango de contaminación del (8,8- 25,12 %), por otra parte, un estudio realizado por Cancino, Díaz, Quevedo, & Villamizar en el 2015 reporta en la

misma especie un rango del (16,5-49,7 %) con el uso de segmentos nodales. Más tarde en una investigación de *Rubus glaucus* Benth realizada por Guamán en el 2018 se obtienen (8,67- 48%) de contaminación a partir de meristemas apicales, los cuales coinciden que se debe aplicar un protocolo de desinfección eficiente antes de la siembra, para poder disminuir la contaminación *in vitro*.

Para el porcentaje de oxidación fenólica en micro estacas de *Rubus glaucus* Benth (Tabla 6) en la etapa de introducción a los 25 días después de la siembra, se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($F= 5,6$; $p<0,001$), las microestacas del tratamiento de luces LEDs Azul- Rojo- Verde y luz Blanca fluorescente (control) presentaron mayor porcentaje con un 41,25% de oxidación fenólica en comparación con los demás tratamientos.

El menor porcentaje de fenolización presentaron los seis tratamientos (Azul; Rojo; Verde; Azul-Rojo; Azul-Verde y Rojo- Verde) con un porcentaje menor al 33%. Según Azofeifa (2009), describe la frecuencia con que el fenómeno de oxidación fenólica afecta especialmente a las especies leñosas en cultivos *in vitro*, destacando la importancia que tiene el protocolo de asepsia y la manipulación del material dentro de la cámara de flujo laminar, señalando el uso de: antioxidantes, explantes en estado juvenil y el crecimiento del explante a baja luminosidad, los cuales ayudan a mitigar el problema.

Más adelante en el 2011 Sigarroa & García, en un estudio de *Rubus glaucus* Benth, reportó un porcentaje de oxidación fenólica $<$ al 33% utilizando ápices meristemáticos. Con lo que podemos notar es que el uso de luces LEDs unicolor también aportan a disminuir este fenómeno.

El número de brotes en microestacas de *Rubus glaucus* Benth, a los 25 días en la etapa de introducción bajo el efecto de diferentes luces LEDs no presentaron diferencias significativas ($F= 0,04$; $p=0,999$) entre tratamientos como se muestra en la tabla 6.

La activación de la yema dentro de cada tratamiento fue en general uniforme exceptuando al tratamiento con luz LED Roja, que produjo más de 1 brote por microestaca, cabe recalcar que la brotación se presentó a diferentes periodos de tiempo.

Con respecto a la misma especie Cancino et al.,2015, obtuvieron resultados semejantes pero en un periodo de 30 días aplicando un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, mientras que en este trabajo se empleó 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad.

(Li, Xu, & Tang, 2010) Realizaron una investigación en el algodón americano al cual aplicaron luces LEDs Roja y Azul quienes mostraron ser adecuadas para el crecimiento de esta especie al contrario del tratamiento control (lámparas fluorescentes) donde el crecimiento fue severamente inhibido. Algo semejante ocurre en el 2015, en un estudio con nudos cotiledonares de *Peltogyne purpurea* Pittier *in vitro*, por Botero & López, utilizando luces LEDs, manifestando una respuesta positiva en la activación de yemas con luz LED Roja y Luz LED azul, consiguiendo 1 brote por nudo concordando con esta investigación en la aplicación de luces.

En la tabla 6 se muestran que se encontraron diferencias significativas en la longitud de yema, evaluados a los 25 días después de la siembra, en la etapa de introducción bajo el efecto de diferentes luces LEDs, la mayor longitud se presentó con el tratamiento luz LED Verde (F= 141,73; p<0,0001), por el contrario, el tratamiento combinado con luz LED Azul-Verde mostraron una menor longitud de yema.

Es importante destacar esta variable con el tratamiento luz LED Verde que mostró una mayor longitud (4,48 cm), ya que al comparar con Páramo (2018) que obtuvo una longitud de yema (2,30 cm) a los 20 días después de la siembra en microestacas de *Rubus glaucus* Benth con aplicación de un fotoperiodo de 24 horas luz sin oscuridad, podemos destacar que el uso de luces LEDs controladas con periodos de oscuridad logran incrementar esta variable.

Algo semejante a este estudio, ocurrió con la experimentación *in vitro* de fresa variedad *Akihime*, realizado por Takamura, Watanabe, Okamoto, Tanaka, & Tan (2003), reportando una altura de 7,9 cm en esta especie con el uso de luz LED Roja a las 4 semanas después de la siembra.

Según Urrestarazu, Kotiranta, & Burés (2018), reportan que la luz verde es percibida por criptocromos y fototropinas ingresando a través del dosel vegetal, esta luz contiene una información valiosa, las plantas que están bajo esta luz suelen tener entrenudos y peciolo alargados con temperatura alta en sus hojas.

La tabla 6 muestra el número de hojas de las microestacas *Rubus glaucus* Benth, donde se encontraron diferencias significativas ($F=3,46;p=0,0028$) entre tratamientos a los 25 días después de la siembra en la etapa de introducción, las luces LEDs que presentaron un mayor número de hojas fue la combinación de (Azul- Rojo- Verde) y (Azul- Rojo) con 4,09 y 3,45 respectivamente, en contraste con la combinación Azul- Verde con 1,50 que fue la menor.

Se evidencia que, con la aplicación de los tratamientos y control se obtuvo el desarrollo de hojas destacándose la combinación de luces LEDs, en comparación con otros estudios realizados en la misma especie tenemos a Sigarrosa & García (2011), que obtuvo a los 30 días después de la siembra de ápices meristemáticos de *Rubus glaucus* Benth, un promedio de 5,48 hojas de utilizando un fotoperiodo de 16 h luz/8 oscuridad al igual que Páramo (2018), reporta esta variable con 5,6 promedio de hojas con un periodo de luz constante de 24 h, se puede señalar que la luz y las longitudes de onda inducen a la organogénesis.

En la figura 9 se muestran la longitud del explante y el número de hojas alcanzadas en la etapa de introducción *in vitro* de *Rubus glaucus* Benth.

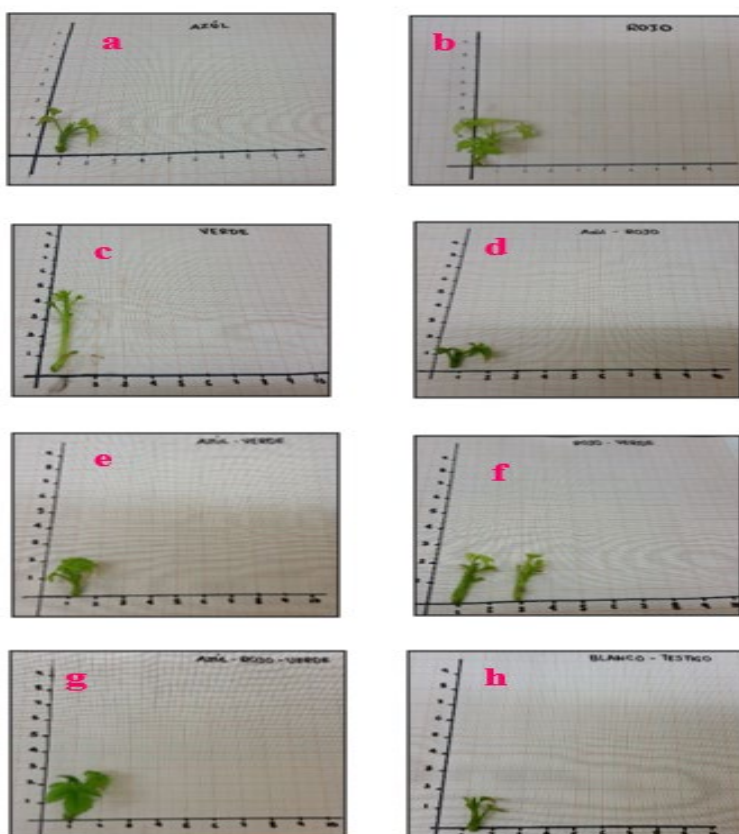


Figura 9. Plántulas de *Rubus glaucus* Benth a los 25 días después de la siembra, bajo el efecto de Luces LEDs a. Azul ($18,3 \mu\text{mol/m. s}^2$); b. Rojo ($5,5 \mu\text{mol/m. s}^2$); c. Verde ($9,2 \mu\text{mol/m. s}^2$); d. Rojo- Azul ($20,1 \mu\text{mol/m. s}^2$); e. Azul- Verde ($12,8 \mu\text{mol/m. s}^2$); f. Rojo- Verde ($22,0 \mu\text{mol/m. s}^2$); g. Azul- Rojo- Verde ($25,6 \mu\text{mol/m. s}^2$) y h. Luz Fluorescente Control Blanco ($14,6 \mu\text{mol/m. s}^2$)

4.2 Etapa de multiplicación

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos de: supervivencia, altura del explante y número de brotes.

Tabla 7

*Promedio ± error experimental de supervivencia, altura y número de brotes a los 60 días en la etapa de multiplicación in vitro en explantos de *Rubus glaucus* Benth, bajo el efecto de diferentes espectros de luces leds en la etapa de introducción, en la Hacienda el Prado, Sangolquí, Ecuador, 2019. LSD ($\alpha = 0,05$).*

Tratamiento	Supervivencia	A.E (cm)	N. B			
	*	**	**			
Azul	0.17±0,07	C	2.25±0,08	e	2.5±0,2	a
Rojo	0.58±0,1	Ab	3.93±0,08	b	1.29±0,1	bc
Verde	0.58±0,12	Ab	5.41±0,08	a	1.17±0,1	c
Azul-Verde	0.42±0,14	Bc	2.24±0,08	e	1.2±0,1	c
Azul-Rojo	0.67±0,14	Ab	3.03±0,08	cd	2.38±0,2	a
Rojo-Verde	0.83±0,14	A	3.16±0,08	c	2.4±0,1	a
Azul-Rojo-Verde	0.75±0,14	Ab	3.16±0,08	c	1.78±0,2	b
Control	0.17±0,07	Bc	2.86±0,08	d	1.33±0,2	bc

A.E ,altura del explante; N. B, número de brotes; n.s, no significante; *, significante $p \leq 0,05$; **, significante $p \leq 0,01$; Luces LEDs: Rojo ($5,5 \mu\text{mol/m. s}^2$); Azul ($18,3 \mu\text{mol/m. s}^2$); Verde ($9,2 \mu\text{mol/m. s}^2$); Rojo- Azul ($20,1 \mu\text{mol/m. s}^2$); Azul- Verde ($12,8 \mu\text{mol/m. s}^2$); Rojo- Verde ($22,0 \mu\text{mol/m. s}^2$); Azul- Rojo- Verde ($25,6 \mu\text{mol/m. s}^2$); Luz Fluorescente Control Blanco ($14,6 \mu\text{mol/m. s}^2$).

En la tabla 7 se muestra el porcentaje de supervivencia de los explantes de *Rubus glaucus* Benth, establecidos en la etapa de multiplicación a los 60 días, encontrando diferencias significativas ($F=1,98$; $p= 0,02$) entre tratamientos, las luces LEDs que presentaron mayor porcentaje de supervivencia fue la combinación Rojo- Verde con el 83,7% mientras que la luz Azul y control obtuvo un 17,7% siendo la más baja.

En relación con esta variable se han conseguido datos por Cancino et al., (2015) en la misma especie obteniendo el 74,3% de supervivencia, utilizando interacción de hormonas

vegetales. Evidenciando que el uso de luz LED y sus combinaciones ayudan notoriamente en esta etapa *in vitro* de *Rubus glaucus* Benth.

Con relación a la longitud de los explantes de *Rubus glaucus* Benth, mostrados en la tabla 7 a los 60 días en la etapa de multiplicación, se encontró diferencias significativas ($F=150,81$; $p<0,0001$) entre tratamientos, los explantes que presentaron una mayor altura fue con el tratamiento de la luz LED Verde (5,41 cm), al contrario de la combinación luz led Azul- Verde que presento menor altura (2,24 cm).

Es decir que la variable altura de explantes, manifestaron resultados favorables con la utilización de luz LED y sus combinaciones es así como la luz favorece en el desarrollo morfogénico del explante al comparar con Zapata (2014), quien utilizó un sistema de inmersión en la etapa de multiplicación con *Rubus glaucus* Benth alcanzando una altura máxima en el explante de 3,37 cm mientras que Páramo (2018), consigue en esta variable 4,02 cm a los 90 días en esta etapa del cultivo.

Según Takamura et al. (2003), obtuvo una altura máxima de 11,1 cm a los 45 días en plantulas de fresa con la aplicación de luz LED Roja concordando con esta investigación ya que se obtuvo resultados óptimos aplicando también luz LED Roja.

Con referencia al número de brotes en la tabla 7 se muestra que existieron diferencias significativas ($F=9,32$; $p<0,0001$) entre tratamientos con relación al número de brotes de los explantes de la etapa de multiplicación a los 60 días donde el tratamiento de luz LED Azul tiene un promedio de 2,5 brotes por explante presentando el mayor número de brotes en contraste con la luz LED Verde que obtuvo 1,17 número de brotes.

Estudios similares en *Rubus glaucus* Benth realizados por Marulanda, Carvajalino, & Vento (2000), se corrobora que en la fase de multiplicación de esta especie por lo general se

obtiene una tasa de 3 a 4 brotes por explante, de la misma manera Páramo (2018), reporta 2,6 brotes nuevos por explante.

En relación con la aplicación de luces LEDs en especies arbóreas estudiadas a nivel *in vitro* se indica que el número de brotes por explante es de 1,4 con luz LED Roja y de 1,1 con luz LED Azul, enfatizando que las longitudes de ondas selectivas pueden mejorar con una estimulación positiva a los explantes (Botero & López, 2015).

En la figura 10 se muestra las diferencias de los explantes en la etapa de multiplicación *in vitro*, bajo el efecto de luces LEDs.



Figura 10. Plántulas de *Rubus glaucus* Benth a los 60 días después de la siembra, etapa de multiplicación *in vitro* bajo el efecto de Luces LEDs a. Azul ($18,3 \mu\text{mol/m. s}^2$); b. Rojo ($5,5 \mu\text{mol/m. s}^2$); c. Verde ($9,2 \mu\text{mol/m. s}^2$); d. Rojo- Azul ($20,1 \mu\text{mol/m. s}^2$); e. Azul- Verde ($12,8 \mu\text{mol/m. s}^2$); f. Rojo- Verde ($22,0 \mu\text{mol/m. s}^2$); g. Azul- Rojo- Verde ($25,6 \mu\text{mol/m. s}^2$) y h. Luz Fluorescente Control Blanco ($14,6 \mu\text{mol/m. s}^2$)

4.3 Etapa de enraizamiento y aclimatación

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos de: número y longitud de raíces.

Tabla 8

Promedio ± error experimental de número y longitud de raíces a los 30 días después de la siembra en la etapa de enraizamiento de Rubus glaucus Benth, bajo el efecto de diferentes espectros de luces leds en la etapa de introducción, en la Hacienda el Prado, Sangolquí, Ecuador, 2019. LSD ($\alpha= 0,05$).

Tratamiento	N.R.		L.R. (mm)	
	**		**	
Azul	0±0,15	e	0±0,4	g
Rojo	1.64±0,16	d	3.92±0,4	ef
Verde	2.17±0,15	c	15.13±0,4	b
Azul-Verde	1.33±0,15	d	4.75±0,4	e
Azul-Rojo	2.08±0,15	c	9.08±0,4	c
Rojo-Verde	2.33±0,15	bc	3.25±0,4	f
Azul-Rojo-Verde	2.75±0,15	ab	6.42±0,5	d
Control	3.08±0,15	a	17.5±0,4	a

N.R. número de raíces; L.R. longitud de raíces; n.s, no significativo; *, significativo $p \leq 0,05$; **, significativo $p \leq 0,01$; Luces LEDs: Rojo ($5,5 \mu\text{mol/m. s}^2$); Azul ($18,3 \mu\text{mol/m. s}^2$); Verde ($9,2 \mu\text{mol/m. s}^2$); Rojo- Azul ($20,1 \mu\text{mol/m. s}^2$); Azul- Verde ($12,8 \mu\text{mol/m. s}^2$); Rojo- Verde ($22,0 \mu\text{mol/m. s}^2$); Azul- Rojo- Verde ($25,6 \mu\text{mol/m. s}^2$); Luz Fluorescente Control Blanco ($14,6 \mu\text{mol/m. s}^2$).

Para el número de raíces (Tabla 8) que se obtuvieron a los 30 días después del inicio de la etapa de enraizamiento, se encontró diferencias ($F=40,43$; $p<0,0001$) entre tratamientos, donde el tratamiento control luz fluorescente Blanca destacó con el mayor número de raíces 3,08 por explante, a diferencia con la combinación de luces leds Azul- Verde con el menor número de raíces 1,33 por explante además se enfatiza la ausencia de raíz con el tratamiento luz LED Azul.

De igual modo Vaca (2012), en la misma especie reporta 3,72 raíces por explante con nitratos reducidos a la mitad en el medio de cultivo. En relación con la aplicación de luces LEDs (Murillo, y otros, 2016) indican que la luz blanca fluorescente y la luz LED Verde emiten menor proporción de radiación estimulando el enraizamiento *in vitro* en plántulas de orquídeas

(*Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis*) ya que ambos tipos de luz emiten una baja radiación en la región roja, al igual que los resultados expuestos anteriormente con *Rubus glaucus* Benth.

En la longitud de las raíces de explantes de *Rubus glaucus* Benth bajo el efecto de luces LEDs y un control, a los 30 días durante de etapa de enraizamiento, en la tabla 8 se muestra que existieron diferencias ($F=164,97$; $p<0,0001$) entre tratamientos, siendo la luz fluorescente Blanco (control) quien tiene la mayor longitud de raíz (17,5 mm) en comparación con la combinación Rojo- Verde (3,25 mm) que tuvo una menor longitud de raíz a la vez que la luz LED Azul presento ausencia de raíz en esta etapa.

La luz fluorescente blanca es quien predominó en la etapa de enraizamiento como se observa en la figura 12 con respecto a la longitud de raíces concordando con Páramo (2018), que consiguió una longitud promedio de raíz (14,4 mm) utilizando la misma fuente de luz.

La Tabla 9 se muestra los resultados de Clorofila A, B y Total en la etapa de enraizamiento.

Tabla 9

Valores de la clorofila A, B y Total en la etapa de enraizamiento en explantes de Rubus glaucus Benth in vitro a los 30 días bajo el efecto de luces LEDs en la Hacienda el Prado, Sangolquí, Ecuador, 2019

Luz par $\mu\text{mol/m. s}^2$	Tratamiento	Clorofila a ($\mu\text{mg. ml}^{-1}$)	Clorofila b ($\mu\text{mg. ml}^{-1}$)	Clorofila total ($\mu\text{mg. ml}^{-1}$)
18.3	Azul	30.73964	33.7306	64.47024
5.5	Rojo	13.91382	9.12946	23.04328
9.2	Verde	34.82648	53.46412	88.2906
20.1	Azul-rojo	30.46199	37.32373	67.78572
12.8	Azul-verde	21.05974	20.56822	41.62796
22	Rojo-verde	24.76769	25.84971	50.6174
25.6	Azul-rojo-verde	23.14671	25.04801	48.19472
14.6	Control	8.24684	0.97516	9.222

En relación con esta variable (tabla 9 y figura 11) se reporta que tanto para la clorofila A, B y Total el tratamiento luz LED Verde es quien reporta datos superiores con referencia a los

demás tratamientos, con clorofila A $34,82 \mu\text{mg. mL}^{-1}$, clorofila B $53,46 \mu\text{mg. mL}^{-1}$ y clorofila total $88,29 \mu\text{mg. mL}^{-1}$; por el contrario, el tratamiento Control con clorofila A $8,24 \mu\text{mg. mL}^{-1}$, clorofila B $0,975 \mu\text{mg. mL}^{-1}$ y clorofila Total $9,22 \mu\text{mg. mL}^{-1}$ fue el que presentó menor contenido de clorofila. Vaca, (2012) Reporta el contenido de clorofila Total $7,79 \mu\text{mg. mL}^{-1}$ en *Rubus glaucus* Benth, utilizando luz fluorescente Blanca, coincidiendo con los datos del Control del análisis de clorofilas de la tabla 9.

En síntesis, la figura 11 se aprecia la correlación entre clorofilas A, B y Total, mostrando diferencias significativas.

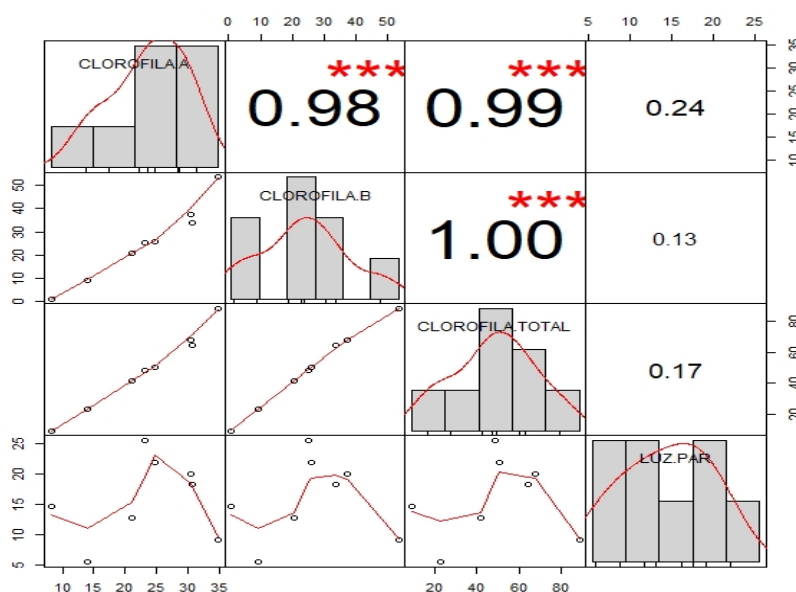


Figura 11. Correlación entre clorofila A, B, Total y Luz PAR de *Rubus glaucus* Benth en la etapa de enraizamiento *in vitro* bajo el efecto de luces LEDs

*** Existen diferencias significativas, por lo tanto, están correlacionados

En la figura 12 se muestra el desarrollo de raíces de *Rubus glaucus* Benth en la etapa de enraizamiento.



Figura 12. Plántulas de *Rubus glaucus* Benth a los 30 días después de la siembra, etapa de enraizamiento in vitro bajo el efecto de Luces LEDs a. Azul (18,3 $\mu\text{mol/m. s}^2$); b. Rojo (5,5 $\mu\text{mol/m. s}^2$); c. Verde (9,2 $\mu\text{mol/m. s}^2$); d. Rojo- Azul (20,1 $\mu\text{mol/m. s}^2$); e. Azul- Verde (12,8 $\mu\text{mol/m. s}^2$); f. Rojo- Verde (22,0 $\mu\text{mol/m. s}^2$); g. Azul- Rojo- Verde (25,6 $\mu\text{mol/m. s}^2$) y h. Luz Fluorescente Control Blanco (14,6 $\mu\text{mol/m. s}^2$)

Etapa de Aclimatación

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos de: porcentaje de supervivencia y número de hojas.

Tabla 10

*Promedio \pm error experimental de supervivencia a los 15 días después de la siembra en la etapa de aclimatación de *Rubus glaucus* Benth, bajo el efecto de diferentes espectros de luces LEDs en la etapa de introducción, en la Hacienda el Prado, Sangolquí, Ecuador, 2019. LSD ($\alpha = 0,05$).*

Tratamiento	Supervivencia	N.H.	
	n.s	**	
Azul	1 \pm 1,60E-05	8.25 \pm 0,8	abcd
Rojo	0.92 \pm 0,08	6.08 \pm 0,7	De
Verde	0.58 \pm 0,14	5.25 \pm 0,6	E
Azul-Verde	1 \pm 1,60E-05	6.5 \pm 0,7	Cde
Azul-Rojo	0.75 \pm 0,13	8.5 \pm 0,8	Abc
Rojo-Verde	0.83 \pm 0,11	9.25 \pm 0,8	Ab
Azul-Rojo-Verde	0.83 \pm 0,11	10 \pm 0,9	A
Control	0.5 \pm 0,14	7.08 \pm 0,7	bcde

N.H., número de hojas; n.s, no significativo; *, significante $p \leq 0,05$; **, significante $p \leq 0,01$; Luces LEDs: Rojo (5,5 $\mu\text{mol/m. s}^2$); Azul (18,3 $\mu\text{mol/m. s}^2$); Verde (9,2 $\mu\text{mol/m. s}^2$); Rojo- Azul (20,1 $\mu\text{mol/m. s}^2$); Azul- Verde (12,8 $\mu\text{mol/m. s}^2$); Rojo- Verde (22,0 $\mu\text{mol/m. s}^2$); Azul- Rojo- Verde (25,6 $\mu\text{mol/m. s}^2$); Luz Fluorescente Control Blanco (14,6 $\mu\text{mol/m. s}^2$).

En la tabla 10 se muestra el porcentaje de supervivencia en plántulas de *Rubus glaucus* Benth en la etapa de aclimatación, donde no existe diferencias significativas entre los tratamientos.

Existe una gran ventaja al utilizar el sistema de iluminación LED en la etapa de aclimatación ya que (Paucar, 2011) logro un 88,88 % de supervivencia en la misma especie, por el contrario que con el uso de luz LED se obtuvo porcentajes de hasta el 100%.

Para respaldar lo indicado Ramos & Ramírez (2016), indican que las plantas necesitan de la luz a partir de su germinación hasta culminar su ciclo vital, además la luz natural puede ser reemplaza por un sistema de iluminación que brinde la intensidad adecuada al cultivo y al mismo tiempo pueda ser controlada ya que puede afectar de manera considerable el desarrollo de la planta si se utiliza una baja intensidad de luz con un corto fotoperiodo

Con respecto al número de hojas (tabla 10) se reporta que las plántulas de *Rubus glaucus* Benth en la etapa de aclimatación bajo los tratamientos de luces LEDs y control, existió diferencias ($F=4,21$; $p=0,0005$) entre tratamientos, donde la combinación de luces LEDs Azul-Rojo- Verde permitió el mayor desarrollo de número de hojas en contraste al tratamiento con luz LED Verde.

Las hojas son indicadores del vigor y estabilidad de las plantas en la etapa de aclimatación ex vitro es así como Takamura et al., (2003) indica que obtuvo un promedio de 5 hojas por plantula de fresa utilizando luces LEDs.

Ciclo de la morfogénesis en las etapas *in vitro* de *Rubus glaucus* Benth bajo el uso de luces LEDs

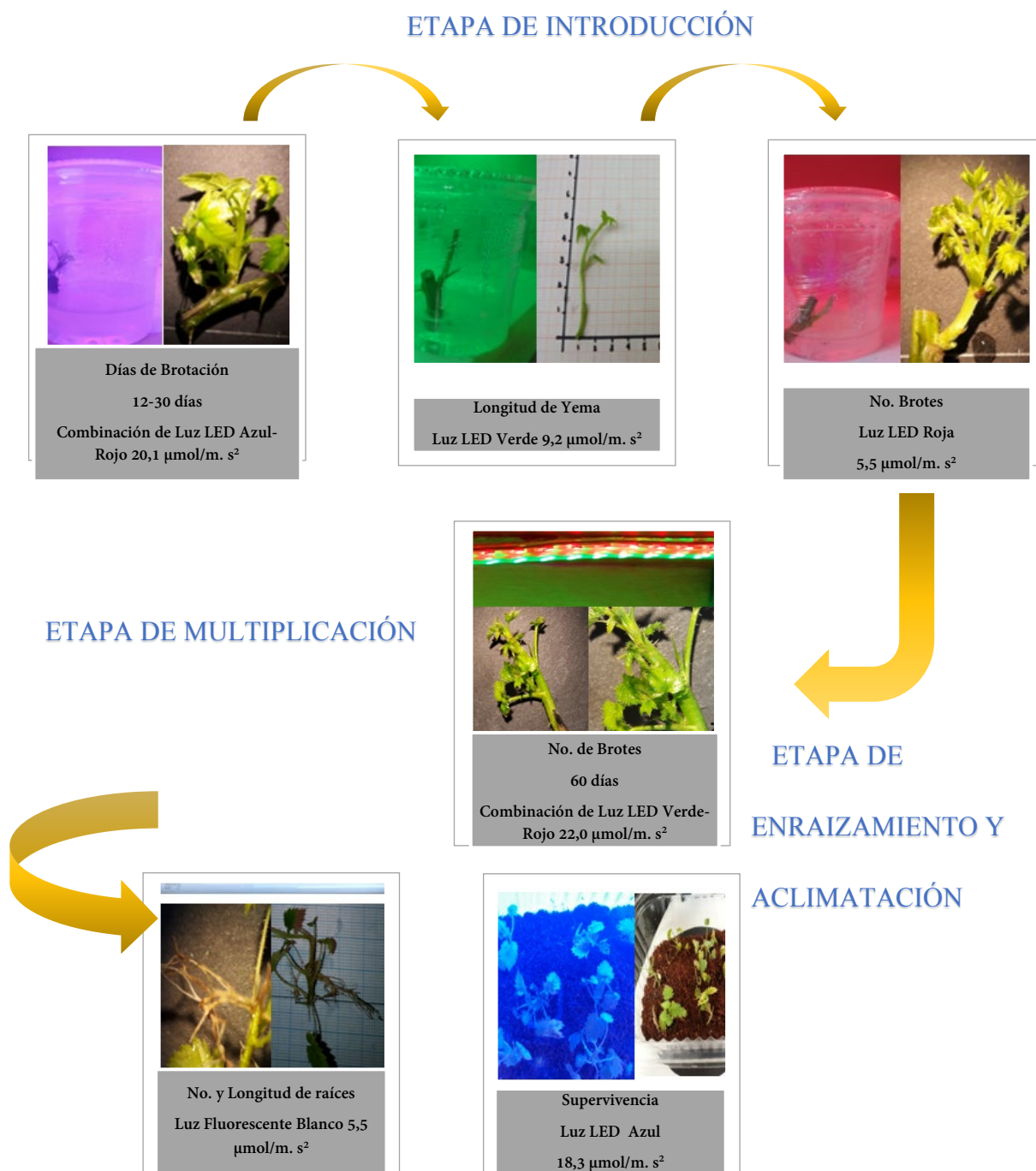


Figura 12. Ciclo *in vitro* de *Rubus glaucus* Benth bajo el efecto de Luces LEDs

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- El uso de luz LED verde y las combinaciones promovieron un mejor proceso de morfogénesis a los explantes de *Rubus glaucus* Benth en condiciones *in vitro*, obteniendo resultados que se destacaron en cada una de las etapas, como la longitud de yema, la brotación de nuevos explantes y en el contenido de clorofila.
- Con la luz LED Roja en la etapa de Introducción *in vitro*, se obtuvieron un promedio de 2 brotes a los 25 días, y se logró una mayor longitud de yema (4,48 cm) bajo el efecto de luz LED Verde.
- En la etapa de multiplicación *in vitro*, se consiguió un promedio de 2 brotes por explante y una tasa de supervivencia del 83%, aplicando la combinación LEDs Rojo- Verde.
- Para la etapa de enraizamiento *in vitro*, se obtuvo un 90% de plántulas enraizadas aplicando la luz fluorescente Control Blanco seguida por el tratamiento luz LED Verde y sus combinaciones con un 80%, además el contenido de clorofila en los explantes durante esta etapa fue superior con el efecto de luz LED Verde (C. T=88,29 $\mu\text{mg. mL}^{-1}$).
- Finalmente, en la etapa de aclimatación se consiguió porcentajes del 100% de supervivencia con el uso de Luz LED y sus combinaciones, evidenciando un promedio de 10 hojas por plántulas.

5.2 Recomendaciones

- Para la fase de introducción *in vitro*, se recomienda utilizar un protocolo de asepsia adecuado con material vegetativo joven, ya que de esto dependerá el avance para las demás etapas.
- En la etapa de introducción se recomienda utilizar la combinación de luces LEDs Rojo-Azul.
- Para obtener mayor número de brotes en la etapa de multiplicación, se recomienda utilizar la combinación de luces LED Rojo- Verde.
- Para enraizamiento *in vitro* es recomendable utilizar luz blanca o luz LED verde.
- En la etapa de aclimatación es recomendable utilizar luces LEDs y sus combinaciones, con mayor porcentaje de luz LED azul.
- Para las etapas de multiplicación, enraizamiento y aclimatación se recomienda utilizar Luces LEDs con periodos de tiempo superior a 8 horas.
- Para la producción de *Rubus glaucus* Benth bajo invernadero es importante realizar estudios aplicando luces LEDs.

5.3 Bibliografía

- Almansa, E. (2011). Sistema Híbrido de Iluminación para el desarrollo de plantas. *Universidad de Granada*.
- Azofeifa, Á. (2009). PROBLEMAS DE OXIDACIÓN Y OSCURECIMIENTO DE EXPLANTES CULTIVADOS IN VITRO. *Agronomía Mesoamericana*, 153-175.
- Botero, L., & López, J. (2015). EFECTO DE DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA PROCEDENTES DE LUCES LED SOBRE EL CRECIMIENTO Y MORFOGÉNESIS DE LA ESPECIE RECALCITRANTE *Peltogyne purpurea* Pittier BAJO CONDICIONES DE CULTIVO IN VITRO. *XVI CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA Y BIOINGENIERIA*.
- Bures, S., Gavilán, M., & Kotiranta, S. (2018). Iluminación artificial en agricultura. *Buresinnova*.
- Cancino, G., García, E., Villamizar, C., & Díaz, C. (2015). Propagation in vitro of selected materials of *Rubus glaucus* Benth (mora de Castilla) in the province of Pamplona, northeastern Colombia. *Scielo*.
- Cano, M. (2013). Aplicación de la micropropagación y la crioconservación ex situ de especies vegetales de interés. *Universidad de Alicante*.
- Cañizares, D. (1998). Regeneración de Caricaceas (*Carica pentagona*) por métodos de micropropagación. *Universidad de las Fuerzas Armadas E.S.P.E. Facultad Ciencias Agropecuarias I.A.S.A.*
- Carney, M., Venetucci, P., & Gesick, E. (2016). LED Lighting in Controlled Environment Agriculture. *Minnesota Department of Commerce, Division of Energy Resources*.

- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas*.
- Díaz, C. (2011). Categorización de la latencia en semillas de mora (*Rubus glaucus* Benth.), para el apoyo a programas de mejoramiento y conservación de la especie. *Universidad Nacional de Colombia*.
- DigitalGlobe. (2019). IASA 1 Map. *Google Earth*.
- Domínguez, A., Domínguez, J., Cruz, S., Santacruz, A., Barrientos, A., Padilla, S., & Gutiérrez, M. (2016). In vitro PROPAGATION OF GUAVA SELECTIONS (*Psidium guajava* L.) . *Universidad Autónoma de Chapingo* .
- Duong, T. N., Takamura, T., Watanabe, H., Okamoto, K., & Tanaka, M. (2003). Responses of strawberry plantlets cultured in vitro under superbright red. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.
- ESPAC . (2018). Manual de recolección de información en campo: Encuestador, Supervisor, Digitador. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua. *Estadísticas Agropecuarias*, 110-115.
- Espinosa, N., Ligarreto, G., Barrero, L., & Medina, C. (2016). Morphological variability of wild blackberry (*Rubus* sp.) cultivars in the Andes of Colombia. *REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS HORTÍCOLAS*.
- Franco, G., Rodríguez, J., & Guevara, N. (2000). ESTACAS DE MORA DE CASTILLA SIN ESPINAS (*Rubus glaucus* Benth). *Centro de desarrollo Tecnológico de Frutales* .
- Fuentes, A., & Lligüín, R. (2015). Uso de auxinas a tres tiempos para enraizamiento de estacas de mora de Castilla sin espinas (*Rubus glaucus* Benth). *Universidad Central del Ecuador* .

- Gárate, M. (2010). TÉCNICAS DE PROPAGACIÓN POR ESTACAS. *UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI*.
- García, E. (2007). La Luz. Naturaleza y Propagación. *Procedimientos y Medios de comunicación*.
- Guamán, D. (2018). Desarrollo de un protocolo de establecimiento in vitro de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) a partir de meristemas axilares. *Universidad Tecnica de Ambato*.
- Hernández, C., Lopera, M., Mora, B., & Cárdenas, J. (1999). Desarrollo de un protocolo para la propagación masiva de mora de castilla (*Rubus galucus* Benth) mediante la utilización de tejidos vegetales in vitro. *Actual Biol*, 3-12.
- Hye, H., & Wheeler, R. (2008). Plant Productivity in Response to LED Lighting. *HORTSCIENCE*.
- INIAP. (2017). EL CULTIVO DE MORA EN ECUADOR . *Ministerio de Agricultura, Ganaderia y Pesca*, 15.
- Jácome, R. (2010). Estudio de la línea base de la cadena productiva de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) en las provincias Bolívar, Cotopaxi y Tungurahua. *Universidad Estatal de Bolívar*.
- Kywi S.A. (2018). *www.kywi.com.ec*. Obtenido de <http://www.kywi.com.ec/iluminaci%C3%B3n>
- Li, H., Xu, Z., & Tang, C. (2010). Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets in vitro. *Plant Cell Tiss Organ Cult*.
- Lligüín, R. (2015). USO DE AUXINAS A TRES TIEMPOS PARA ENRAIZAMIENTO DE ESTACAS DE MORA DE CASTILLA SIN ESPINAS (*Rubus glaucus* Benth). *Universidad Central del Ecuador*.
- Malajovich, M., & Soares, V. (2004). Biotecnología: enseñanza y divulgación. *Instituto de Tecnología ORT de Rio de Janeiro*.

- Martínez, A., Vásquez, W., Viteri, P., Jácome, R., & Ayala, G. (2013). Ficha Técnica de la variedad de mora de espinas sin espinas (*Rubus glaucus* B.) INIAP-Andimora. *Programa Nacional de Fruticultura*. , 1-2.
- Martínez, J., Monte, E., & Ruiz, F. (2002). Los fotocromos son unos pigmentos vegetales que controlan diferentes aspectos del desarrollo e informan a las plantas de los cambios operados en el entorno para optimizar su crecimiento. *Investigación y Ciencia*.
- Martínez, R., Azpíroz, H., Rodríguez, J., Cetina, V., & Gutirrés, M. (2005). ACLIMATACIÓN DE PLANTAS OBTENIDAS in vitro DE *Eucalyptus urophylla* S. T. BLAKE Y *Eucalyptus grandis* HILL EX MAIDEN . *Ra Ximhai*.
- Marulanda, M., Carvajalino, M., & Vento, H. (2000). ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN IN VITRO DE PLANTAS SELECCIONADAS DE *RUBUS GLAUCUS* BENTH PARA EL DEPARTAMENTO DE RISARALDA (COLOMBIA). *Actual Biol*.
- Mazzella, M. (2001). Interacción entre fitocromos y criptocromos en el control del crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *Universidad de Buenos Aires*.
- Meisel, L., Urbina, D., & Pinto, M. (2011). Fotorreceptores y Respuestas de Plantas a Señales Lumínicas. *Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile*.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. *Physiologia plantarum*, 473-497.
- Murillo, M., Pedraza, M., Gutiérrez, N., Rodríguez, M., Lobit, P., & Martínez, A. (2016). CALIDAD DE LUZ LED Y DESARROLLO in vitro DE *Oncidium tigrinum* Y *Laelia autumnalis* (ORCHIDACEAE). *Scielo*.

- Olmos, S., Luciani, G., & Galdeano, E. (2016). Métodos de propagación y conservación de germoplasma. *INTA Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*.
- Pachacama, D. (2018). Obtenido de Universidad de las Fuerzas Armadas- E.S.P.E- I.A.S.A 1.
- Paniagua, G., Hernández, C., Rico, F., Domínguez, F., Martínez, E., & Martínez, C. (2015). EFECTO DE LA LUZ LED DE ALTA INTENSIDAD SOBRE LA GERMINACIÓN Y EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE BRÓCOLI (BRASSICA OLERACEA L.). *Polibotánica* .
- Páramo, C. (2018). Estudio del efecto hormético y antimicrobiano de nanoplasta en la regeneración in vitro de *Rubus Glaucus Benth*. *Universidad de las Fuerzas Armadas - E.S.P.E- I.A.S.A*.
- Patiño, C. (2012). AVANCES DE LA MICROPROPAGACIÓN in vitro DE PLANTAS LEÑOSAS. *UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA (UNAD)*.
- Paucar, M. (2011). ORGANOGÉNESIS DIRECTA in vitro A PARTIR DE EXPLANTES DE HOJAS DE MORA (*Rubus glaucus Benth*). *Universidad de las Fuerzas Armadas E.S.P.E*.
- Ramos, Y., & Ramírez, E. (2016). Development of an artificial LED lighting system for indoor farming. *Informador Técnico (Colombia)*.
- Rodríguez, M. (2018). CULTIVO IN VITRO: ALTERNATIVA AL CULTIVO TRADICIONAL DE PLANTAS MEDICINALES. *UNIVERSIDAD COMPLUTENSE*.
- Rojas, J., García, N., & Alarcón, J. (2004). Propagación asexual de plantas. . *Universidad de Colombia*.
- Romero, G., Castillo, D., & Luis, Q. (2017). MORA: ¿FUENTE DE INGRESOS PARA PRODUCTORES Y COMERCIALIZADORES?. UN ENFOQUE DESDE EL

ANÁLISIS DE LA DINÁMICA DEL MERCADO DE LAS FAMILIAS DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA. ESTUDIO DE CASO: PARROQUIA EL ALTAR, ECUADOR. *European Scientific Journal (ESJ)*.

Saeid, M. (2017). Plant Productivity in Response to LEDs Light Quality. *Greenhouse Research Scientist*.

Sánchez, L., & Lucena, M. (2017). EMISIONES DE MERCURIO POR USO DE LAS LÁMPARAS FLUORESCENTES COMPACTAS Y POR GENERACIÓN DE ENERGÍA ELÉCTRICA A BASE DE COMBUSTIBLES FÓSILES. *Revista Científica ECOCIENCIA*.

Segretín, M. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). *ArgenBio*.

Sigarroa, A., & García, C. (2011). Stablishment and in vitro multiplication of thornless blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) by shoot apical meristems. *Universidad Francisco de Paula Santander*.

Sumanta, N., Choudhury, H., Jaishe, N., & Roy, S. (2014). Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents. *Research Journal of Chemical Sciences*, 63- 69.

Takamura, T., Watanabe, H., Okamoto, K., Tanaka, M., & Tan, D. (2003). Responses of strawberry plantlets cultured in vitro under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.

Tamayo, C. (2014). Tasa de incremento lumínico óptimo durante la aclimatación in vitro de *Nothofagus alpina* (*Nothofagus alpina* Poepp et Endl (Oerst)). *Universidad Austral de Chile*, 4-6.

- Tofiño, M. (2017). Optimización de la producción de alcaloides en *Zephyranthes carinata* por medio de Organogénesis o Embriogénesis Somática in vitro. *UNIVERSIDAD ICESIFALCUTAD DE CIENCIAS NATURALES, DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS*.
- Urrestarazu, M., Kotiranta, S., & Burés, S. (2018). ILUMINACIÓN ARTIFICIAL EN HORTICULTURA. *ResearchGate*.
- Vaca, I. (2012). "Regeneración de plantas completas de *Rubus glaucus* (Benth), mediante el uso de reguladores de crecimiento". *Escuela Politecnica del Litoral ESPOL*.
- Valladares, F., Aranda, I., & Sánchez, D. (2004). La luz como factor ecológico y evolutivo para las plantas y su interacción con el agua. *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*.
- Velástegui, A., Proaño, T., & Zurita, J. (2017). Exportación de pulpa congelada de mora desde Ecuador hacia el mercado Chino. *Universidad Técnica de Ambato* .
- Villalobos, V., & Thorpe, T. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados . *Cultivo de tejidos en la Agricultura* , 127- 141.
- Zapata, C. (2014). EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EXPLANTES DE MORA SIN ESPINA "Rubus glaucus Benth" EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN VEGETATIVA EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL. *Universidad de las Fuerzas Armadas E.S.P.E.*