



Efecto del ácido indol butírico y calcio sobre la aclimatación de explantes de *Rubus glaucus Benth* sin espinas

Padilla Ramírez, Sergio Ignacio

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario

Ing. Landázuri Abarca, Pablo Aníbal Mgs.

4 de julio de 2022



Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, “**Efecto del ácido indol butírico y calcio sobre la aclimatación de explantes de *Rubus glaucus Benth* sin espinas**” fue realizado por el señor Padilla Ramírez, Sergio Ignacio; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 4 julio de 2022

Firma



Firmado digitalmente por:
**PABLO ANIBAL
LANDAZURI
ABARCA**

.....
Landázuri Abarca, Pablo Aníbal Mgs

CC: 1708262348



Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Responsabilidad de Autoría

Yo, Padilla Ramírez, Sergio Ignacio, con cedula de ciudadanía nº 1751265065, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Efecto del ácido indol butírico y calcio sobre la aclimatación de explantes de *Rubus glaucus Benth* sin espinas”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 4 julio de 2022

Firma

Padilla Ramírez, Sergio Ignacio

CC: 1751265065



Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Autorización de Publicación

Yo, Padilla Ramírez, Sergio Ignacio, con cedula de ciudadanía n° 1751265065, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **"Efecto del ácido indol butírico y calcio sobre la aclimatación de explantes de *Rubus glaucus Benth* sin espinas"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 4 julio de 2022

Firma

Padilla Ramírez, Sergio Ignacio

CC: 1751265065

Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos

Padilla Sergio TESIS Mora.dcox

Scanned on: 3:48 June 27, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	602
Words with Minor Changes	102
Paraphrased Words	184
Omitted Words	0

Firma

firmado electrónicamente por:
**PABLO ANIBAL
LANDÁZURI
ABARCA**

.....
Landázuri Abarca, Pablo Anibal Mgs

CC: 1708262348

Dedicatoria

A Dios por ser mi Padre y el que levanta mi cabeza por enviarme, por guiarme y fortalecerme para poder avanzar en toda la trayectoria de la carrera.

A mi Madre, Ketty Lourdes Ramírez Quijije, por ser mujer virtuosa y una constructora de vida, por su paciencia, su amor, su apoyo incondicional y en especial por enseñarme desde el ejemplo, la fidelidad a Dios, el trabajo duro y que todo lo que me proponga lo puedo lograr.

A Verónica Enríquez, por ser memorial de la obra de Dios en mi vida, por ser la novia de mi juventud y por darme animo durante el proceso de la tesis.

A Marco Vaca, Pahola Guevara y la Casa del Dabar por ser mentores de vida y brindarme apoyo incondicional, son un ejemplo para mí.

A Marcia Chiriboga, quien a pesar de no encontrarse con nosotros me dio el apoyo y la confianza para iniciar esta hermosa carrera.

Sergio Ignacio Padilla Ramírez

Agradecimientos

Agradezco Principalmente a la empresa Agrobiotech, al Ing. Pablo Landázuri y su esposa la Ing. Patricia Sandoval por darme la confianza, abrirme las puertas de su casa y el apoyo para poder realizar el presente trabajo, siempre tendrán mi gratitud y apoyo.

Agradezco a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE y la Carrera de Ingeniería Agropecuaria – IASA 1, por darme una formación holística y brindarme las herramientas para la vida profesional, No somos los únicos, somos los mejores.

A los docentes de la Carrera Agropecuaria por su acompañamiento y vocación de enseñanza, en especial al Ing. Pablo Landázuri, Ing. Norman Soria, Dr. Jorge Ron, e Ing. Elizabeth Urbano por alentarme durante mi proceso.

A mis tutores de tesis el Ing. Jaime Villacis y Dr. Cesar Falconi porque sin sus motivaciones no me hubiese decidido por la realización del presente trabajo, sus consejos fueron oportunos.

Al personal de la empresa Agrobiotech, a Don Guillermo Velazco por siempre estar presto a ayudarme y a la Señora Alexandra Castillo por su generosidad y por transmitirme toda su experiencia los recuerdo con mucho aprecio.

Finalmente, quiero agradecer a mis amigos de la Universidad Jorge Reascos, Miguel Gutierrez, Wendy Topanta, Alejandro Ñacato y Kevin Jurado por la paciencia, por todo su apoyo cuando queria rendirme y enseñarme el valor de la amistad.

Sergio Ignacio Padilla Ramírez.

Índice de contenidos

Carátula	1
Certificación	2
Responsabilidad de autoría.....	3
Autorización de publicación.....	4
Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de contenidos.....	8
Índice de Tablas	11
Índice de figuras.....	12
Resumen	13
Abstract	14
Capítulo 1.....	15
Introducción.....	15
Antecedentes	15
Justificación.....	16
Objetivos	16
Objetivo General	16
Objetivos Específicos.....	16
Hipótesis	17
Capítulo II.....	18
Revisión de Literatura	18

Género Rubus	18
Mora de castilla sin espina (<i>Rubus glaucus Benth</i>).....	19
Cultivo in vitro del género Rubus	20
Aclimatación de explantes	21
Ácido Indol Butírico (AIB)	23
Calcio y su interacción con las auxinas	24
Capítulo III.....	26
Metodología	26
Ubicación y Materiales del Experimento	26
Manejo del experimento.....	27
Variables evaluadas	29
Fase Enraizamiento in vitro	29
Fase Aclimatación post vitro	30
Variables Morfométricas.....	31
Peso Fresco y Materia Seca	31
Diseño experimental y análisis de datos	32
Análisis Económico.....	34
Capítulo IV	35
Resultados y Discusión.....	35
Resultados.....	35
Variables Morfométricas.....	35
Peso fresco y Materia Seca	37

Análisis Económico.....	38
Discusión.....	39
Enraizamiento y Aclimatación.....	39
Variables Morfométricas, Peso Fresco y Materia seca.....	40
Análisis económico.....	41
Capítulo V.....	42
Conclusiones y Recomendaciones.....	42
Conclusiones.....	42
Recomendaciones.....	42
Bibliografía.....	43

Índice de Tablas

Tabla 1	Tratamientos y niveles de los Factores.....	27
Tabla 2	Precios y presentaciones del AIB al 98% y el Cloruro de Calcio Dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), transformados a \$/mg de cada reactivo.	34
Tabla 3	ANAVA de las variables morfométricas de plántulas in vitro de <i>Rubus glaucus</i> Beth tratadas con diferentes combinaciones de CaCl_2 y AIB	35
Tabla 4	Promedio \pm error estándar de las variables morfométricas de plántulas in vitro de <i>Rubus glaucus</i> Beth tratadas con diferentes dosis de AIB.	36
Tabla 5	ANAVA del peso fresco y materia seca de plántulas in vitro de <i>Rubus glaucus</i> Beth tratadas con diferentes combinaciones de CaCl_2 y AIB	37
Tabla 6	Promedio \pm error estándar de la materia seca de plantulas Invitro de <i>Rubus glaucus</i> Benth aclimatadas y enraizadas en diferentes combinaciones de AIB y CaCl_2	37
Tabla 7	Análisis de Costos variables y margen bruto para los nueve tratamientos considerando un lote de 2000 plantulas introducidas a climatación.	38

Índice de figuras

Figura 1	Datos técnicos de la turba.....	27
Figura 2	Esquema de la unidad experimental	28
Figura 3	Vista Frontal del experimento.....	29
Figura 4	Vista lateral del experimento	29
Figura 5	Verificación de explantes enraizados	30
Figura 6	Toma de medidas del tallo y raíces de las plántulas.....	31
Figura 7	Croquis Experimental	33
Figura 8	Altura y numero de hojas de plántulas <i>Rubus glaucus</i> Beth tratadas con diferentes niveles de AIB.....	36

Resumen

La demanda mundial de cultivos de bayas ha aumentado significativamente en los últimos años debido a sus componentes antioxidantes y beneficios para la salud. En Ecuador el principal cultivo de bayas es la mora de Castilla *Rubus glaucus Benth.* La micropropagación *in vitro* es una herramienta biotecnológica útil para obtener plantas del género *Rubus* genéticamente homogéneas, productivas y sanas. La falta de raíces para evitar la deshidratación en la fase de aclimatación es una de las principales causas de pérdida de plántulas micropropagadas de mora de Castilla. Este ensayo tuvo como objetivo registrar los efectos de la auxina ácido indol-3-butírico (AIB) y del cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) como fuente de Ca^{2+} sobre el enraizamiento, la aclimatación, las variables morfométricas, el peso fresco y la materia seca de las plántulas micropropagadas de mora de Castilla sin espinas *Rubus glaucus Benth.* Los explantes de todos los tratamientos fueron enraizados *in vitro* y aclimatados *ex vitro*, el AIB tuvo un efecto significativo sobre la longitud del tallo y el número de hojas; a pesar de que no se encontró un efecto significativo de la interacción $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \times \text{AIB}$ sobre ninguna de las variables. El T1 ($0 \text{ mg L}^{-1} \text{ AIB} + 0 \text{ mM CaCl}_2$) se destacó del resto de tratamientos, al presentar una longitud de tallo de $11,3 \pm 2 \text{ cm}$ y materia se seca de $82,94 \pm 15,91 \text{ mg}$; este fenómeno podría explicarse por la producción y acumulación de etileno relacionado con la aplicación exógena y la interacción $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \times \text{AIB}$ durante la fase de enraizamiento. Hasta donde llega el conocimiento de nuestra investigación, este es el primer ensayo en reportar el enraizamiento y la aclimatación de plantulas de *Rubus glaucus Benth sin espinas en ausencia de AIB y Cloruro de calcio.*

Palabras clave: mora de Castilla sin espinas, enraizamiento *in vitro*, aclimatación, AIB, CaCl_2

Abstract

The global demand for berry crops had increased significantly in recent years due to its antioxidant components and health benefits, in Ecuador the main berry crop is the Andean blackberry *Rubus glaucus* Benth. In vitro micropropagation is a useful biotechnological tool to obtain genetically homogeneous, productive, and healthy plants of the *Rubus* genus. The lack of roots to avoid dehydration in the acclimatization phase is one of the main causes of loss of micropropagated thornless Andean blackberry plantlets. The purpose of this trial was to record the effects of the auxin indole-3-butyric acid (IBA) and calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) as a source of Ca^{2+} on rooting, acclimatization, morphometric variables, fresh weight and dry matter of micropropagated plantlets of thornless blackberry *Rubus glaucus* Benth. The plantlets of all treatments were rooted in vitro and acclimatized ex vitro, IBA had a significant effect on stem length and number of leaves; Although no significant effect of the $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O} \times \text{IBA}$ interaction was found on any of the variables, T1 (0 mg L⁻¹ IBA + 0 mM CaCl_2) stood out from the rest of the treatments, presenting a stem length of 11.3 ± 2 cm and dry matter of 82.94 ± 15.91 mg; This phenomenon could be explained by the production and accumulation of ethylene related to the exogenous application an interaction of $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O} \times \text{IBA}$ during the rooting phase. To our knowledge, this is the first trial to report rooting and acclimatization of thornless *Rubus glaucus* Benth plantlets in the absence of IBA and calcium chloride.

Keywords: thornless Andean blackberry, in vitro rooting, acclimatization, AIB, CaCl_2

Capítulo 1

Introducción

Antecedentes

La fase final de la micropropagación *in vitro* es conocida como aclimatación y es generalmente la más difícil; se caracteriza por la alta mortalidad de los explantes debido a la transición de las condiciones controladas *in vitro* a las condiciones *ex vitro* (Clapa et al., 2009). Los explantes cultivados *in vitro* presentan anomalías morfológicas, anatómicas y fisiológicas como resultado de las condiciones especiales donde se desarrollan, estas anomalías favorecen la rápida deshidratación en ambientes normales, la plántula debe corregir estas anomalías durante la fase de aclimatación (Pospíšilová et al., 1999; Rohr et al., 2003).

Las fases de enraizamiento y aclimatación de la mora de castilla, *Rubus* sp. presentan una diversidad de métodos que varían entre especies e inclusive entre variedades (Donnelly & Daubeny, 1986). La micropropagación de especies *Rubus* sp. sin espinas se caracteriza por presentar bajas tasas de enraizamiento y aclimatación respecto a las especies con espinas (Finne, 1986; Zimmerman, 1981).

El uso de AIB para aumentar la actividad rizogénica *in vitro* ha sido demostrado en otras especies incluidas algunas variedades de mora sin espinas (McPheeters et al., 1988; Najaf-Abadi & Hamidoghli, 2009). El calcio ha demostrado ser un elemento clave en la movilidad de las auxinas y la formación de raíces en varias especies vegetales (Vanneste & Friml, 2013). En base a la revisión bibliográfica realizada, no se han encontrado investigaciones en las cuales se determine el efecto de la interacción del AIB y calcio sobre la aclimatación de *Rubus glaucus* Benth sin espinas.

Justificación

La mora de los Andes o mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) es un cultivo de importancia económica en el Ecuador, tiene una extensión aproximada de 5000 ha ubicadas en la región Sierra; además, se calcula que es la actividad principal de alrededor de 15000 pequeños y medianos agricultores (INIAP, 2016). El uso de técnicas de micropropagación *in vitro* permite dotar a los productores de plantas de buena calidad genética y fitosanitaria en cantidades suficientes para la producción (Marulanda et al., 2000).

La ventaja de usar genotipos de mora sin espina radica en la reducción de costos operativos además, algunas variedades presentan la misma productividad y el mismo tamaño de fruto que las plantas con espina por este motivo su cultivo ha sido ampliamente difundido entre los productores (Marulanda & Lopez, 2009). La presente investigación propone evaluar el efecto de diferentes dosis *in vitro* AIB y calcio sobre la masa fresca y el porcentaje de aclimatación de *Rubus glaucus* Benth sin espinas.

Objetivos

Objetivo General

Identificar la dosis óptima del AIB y Cloruro de Calcio para el enraizamiento de explantes y aclimatación de plántulas económicamente viables de mora sin espinas *Rubus glaucus* Benth.

Objetivos Específicos

Determinar el efecto de las dosis de AIB y Cloruro de Calcio sobre el enraizamiento y la aclimatación de explantes de mora de Castilla sin espinas *Rubus glaucus* Benth.

Evaluar el efecto de las dosis AIB y Cloruro de Calcio sobre las variables morfométricas, el peso fresco y materia seca de las plántulas de mora de Castilla sin espinas *Rubus glaucus* Benth.

Establecer el tratamiento económicamente viable para la aclimatación de plantas de mora sin espinas *Rubus glaucus* Benth.

Hipótesis

H0: Los explantes *in vitro* de *Rubus glaucus* Benth tratados con una dosis de 3,0 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 2 g L⁻¹ de AIB no presentan igual cantidad de materia seca post vitro que los explantes no tratados.

H1: Los explantes *in vitro* de *Rubus glaucus* Benth tratados con una dosis de 3,0 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 2 g L⁻¹ de AIB presentan igual cantidad de materia seca post vitro que los explantes no tratados.

Capítulo II

Revisión de Literatura

Género Rubus

El género Rubus perteneciente a la familia Rosaceae contiene más de 500 especies altamente variables y heterocigóticas, con un rango de niveles de ploidía desde diploide a duodecaploide, las Rubus están distribuidas en la mayoría de zonas del mundo a excepción de las regiones desérticas (Jennings et al., 1991).

Las especies del género Rubus se caracterizan por tener altos niveles de vitaminas A, C y E; sin embargo, lo que los distingue del resto de géneros es sus elevados contenidos de compuestos fenólicos fuertemente antioxidantes, estas características les han otorgado a estas especies la categoría de frutas promotoras de la salud lo cual ha generado una creciente relevancia económica en torno a su producción y cultivo (Graham & Woodhead, 2011).

Graham & Woodhead (2011) mencionan que entre las especies de mayor importancia comercial del género Rubus se encuentran las moras y las frambuesas además describen botánicamente al género como arbustos espinosos erectos o semierectos que producen brotes de renovación desde el suelo llamados cañas, son plantas perennes porque cada arbusto consta de cañas bienales, que se superponen con el pasar del tiempo; las hojas están compuestas de 3-5 folíolos con márgenes dentados o irregularmente dentados, siendo el medio el más grande, las flores son de color blanco a rosa y varían de tamaño entre 0,5 a 1,5 cm, en la flor se encuentran de 60 a 90 estambres y su gineceo consta de 60 a 80 ovarios, cada uno de los cuales se convierte en un drupa; en general presentan cinco sépalos, cinco pétalos, un hipantio muy corto, muchos estambres y un gineceo apocárpo de muchos carpelos en un

receptáculo en forma de cono, producen un fruto de tipo polidrupas donde la drupas individuales unidas por pelos casi invisibles.

Mora de castilla sin espina (*Rubus glaucus* Benth)

La mora de Castilla *Rubus glaucus* Benth también conocida como mora de los Andes es una especie del género *Rubus* que combina características de los de las frambuesas negras de subgénero *Idaeobatus* y de las Moras del subgénero *Rubus*, por tal motivo se define como un híbrido interespecíficos fértil con una dotación doble de cromosomas es decir anfiploide y alelotetraploide (Jennings, 1988).

Rubus glaucus Benth está presente sobre los 800 msnm en las tierras altas de los trópicos desde México a Ecuador y se cultiva por sus frutos que se consumen crudos, en jaleas y refrescos; es una planta perenne que emite cañas de un tallo corto formando un macollo de hasta 5 m de diámetro, las ramas están provistas de espinas curvas mientras que los tallos jóvenes y el revés de las hojas están cubiertos de una cera blancuzca que le da el tono característica de esta especie, las hojas están compuestas por tres folíolos elípticos dos basales opuestos y uno terminal y poseen bordes finamente cerrados además en el lado inferior de la hoja hay espinas curvas y agudas, las flores brotan en racimos terminales y están compuestas de un perianto con un cáliz de 5 sépalos agudos y persistentes y una corola de aproximadamente 2,5 cm de diámetro con cinco pétalos blancos o rosados, el perianto está inserto en el receptáculo o hipantio de cuya base discoidal salen muchos estambres prolongados hacia arriba en forma cónica en el que están insertados numerosos carpelos, el fruto generalmente resulta del desarrollo conjunto de los carpelos y del hipantio los primeros están llenos de líquido rojo morado acidulado de sabor agradable y contiene semillas diminutas mientras que los tejidos del hipantio son más suaves y menos jugosos, los frutos miden de 2 a 3 cm de largo y su perfil varían de circular a elíptico (León, 2000).

La ausencia de espinas dentro de las especies del género *Rubus* es una característica monogénica controlada por un gen recesivo que ha sido ampliamente estudiado en múltiples especies y variedades, en Latinoamérica los agricultores colombianos del departamento del Quindío descubrieron un biotipo de mora sin espinas, que ha sido multiplicado y distribuido en varios países de la zona incluidos Ecuador. (Marulanda et al., 2007; Marulanda & Lopez, 2009).

Cultivo in vitro del género *Rubus*

Los primeros registros del uso de explantes in vitro de las especies *Rubus* datan de la década de los 70's, la aplicación de métodos de cultivo de tejidos tenía como finalidad obtener lotes de frambuesa libres de virus a través de termoterapia; con el paso de los años se motivó a los productores a usar plantas de origen in vitro para garantizar altos rendimientos y homogeneidad en la producción (Smith, 1984). El uso de la propagación in vitro y la combinación de diversos factores han sido ampliamente estudiados dentro de las especies *Rubus* por ejemplo: McPheeters et al. (1988) describe a detalle varias metodologías de propagación in vitro de moras y frambuesas, así mismo se encuentra una gran variedad de trabajos realizados en cuanto a la aclimatación post vitro del género *Rubus* (Clapa et al., 2013, 2015; Fira et al., 2012; Villa et al., 2006).

McPheeters et al. (1988) mencionan que los métodos tradicionales de propagación de las *Rubus* presentan varias limitaciones, por una parte, cuando se utilizan métodos de propagación asexual los esquejes poseen un número limitado de yemas viables para la multiplicación, la estación puede afectar la viabilidad de los esquejes y existe la alta probabilidad de propagar enfermedades provenientes de plantas madres enfermas; por otra parte cuando se utilizan métodos de propagación sexual, las semillas obtenidas no presentan homogeneidad genética y generalmente requieren largos procesos de escarificación y estratificación.

La rápida multiplicación de brotes en el cultivo de tejidos (de hasta 30 veces de un solo brote después de solo 30 días en cultivo) y la posibilidad de tratamientos para obtener explantes libres de virus a través de termoterapia ha permitido que el tejido de cultivos sea una alternativa viable para la producción masiva de lotes libres de virus de especies *Rubus* de interés económico; también es importante destacar que la mayoría de cultivos de tejidos in vitro de las especies *Rubus* se llevan a cabo con variaciones del medio MS únicas y específicas para cada especie de *Rubus*, estas variaciones incluyen: la disminución parcial de las sales minerales de MS, la adición de diferentes fuentes de carbohidratos, vitaminas, tipos de gelificantes y reguladores de crecimiento entre otros componentes (Bobrowski et al., 1996).

El primer trabajo de propagación in vitro de mora de castilla *Rubus glaucus* Benth fue realizado por Marulanda et al. (2000) cuyo objetivo fue establecer un protocolo que permitiera abastecer a los productores locales la cantidad suficiente de plantas con buena calidad genética y fitosanitaria, más tarde Vaca & Landázuri (2013) demostraron que los brotes in vitro de *Rubus glaucus* Benth sin espinas cultivados en medio Murashige & Skoog (1962) al 50% de concentración de sales, presentaron mayor número de raíces, hojas y porcentaje de enraizamiento in vitro y ex vitro respecto a la concentración Murashige y Skoog al 100%, por otra parte Andrade et al. (2021) probó 8 diferentes tipos de medios basales in vitro de explantes de *Rubus glaucus* Benth y concluyó que el medio óptimo para las tres fases del cultivo in vitro es Murashige y Skoog en combinación con 2 mg L⁻¹ de ácido giberélico, 0,75 mg L⁻¹ de bencilaminopurina (BAP), y 1 mg L⁻¹ de ácido indol butírico (AIB), para las fases de introducción, multiplicación y enraizamiento respectivamente.

Aclimatación de explantes

La palabra aclimatación hace referencia a la fase final del cultivo de tejidos dónde se produce la transición de los explantes de condiciones in vitro a condiciones in vivo (

invernadero o campo abierto) es importante comprender qué el éxito este proceso depende la calidad intrínseca del material vegetal; el enraizamiento puede suceder tanto en condiciones in vitro mediante la adición controlada de auxinas en el medio, cómo en condiciones ex vitro mediante el uso de sustratos orgánicos e inorgánicos, la adición de soluciones nutritivas y auxinas ya sea para generar la inducción de raíces o aumentar la cantidad y mejorar la calidad de las raíces generadas previamente (Debergh, 1991).

Las condiciones especiales en las que crecen los explantes durante el cultivo de tejidos in vitro incluyen: alta humedad relativa, baja luminosidad, ausencia de intercambio gaseoso, fuentes de energía suministradas por los sacáridos suministrados en el medio, ambientes asépticos y el suplemento de altas cantidades de reguladores de crecimiento, todas estas condiciones dan como resultado explantes con una morfología, anatomía y fisiología anormal, está demostrado que los explantes in vitro tienen deficiencias en la estructura estomática, mesófilo no diferenciado, una cutícula muy poco desarrollada, estructura y número anormal de cloroplastos y no poseen la capacidad de generar sus propios azúcares (semiautotrófia) dando como resultado altas mortalidades por deshidratación al momento de trasladar los explantes a condiciones in vivo debido a la incapacidad de regular la transpiración e intercambio de gases sumado al deficiente aprovechamiento de la luz para la producción azúcares; es importante que durante esta última fase la planta corrija todas las anormalidades mencionadas mediante el cambio gradual de las condiciones ambientales (Pospíšilová et al., 1999).

La fase de aclimatación requiere del desarrollo de un conjunto de métodos y técnicas específicas para la especie en investigación o producción , los factores que afectan la fase de aclimatación puede ser tanto in vitro (anteriores a la aclimatación), como post vitro (durante la aclimatación) (Debergh, 1991)

Ácido Indol Butírico (AIB)

Los reguladores de crecimiento se definen como sustancias sintéticas que tienen una actividad biológica igual o superior al efecto de las hormonas naturales en las plantas, entre los reguladores de crecimiento más usados en el cultivo de tejidos in vitro se encuentran las auxinas, las citoquininas y la interacción de ambas; debido a que son fundamentales para regular procesos de organogénesis (Gaspar et al., 1996).

Las auxinas son un tipo de fitohormonas que comparten la capacidad de promover el crecimiento y la división celular en el cultivo de tejidos, entre las más empleadas se encuentra el Ácido Indol butírico (AIB) (Epstein & Ludwig-Müller, 1993). El AIB fue aislado y descrito por primera vez por Blommaert (1954) y sintetizado químicamente por Sutter & Cohen (1992).

El AIB es una molécula estable y de lenta liberación, a diferencia del ácido indol acético (AIA); en ensayos en maíz (*Zea mays* L.) se ha demostrado que las membranas microsomales del maíz pueden convertir AIA en AIB utilizando ATP y acetyl-CoA como cofactores mientras que el AIB se convierte en AIA a través de la β -oxidación de una manera dependiente del peroxisoma, es importante comprender que dentro de los tejidos el AIB debe ser transformado en AIA para tener un efecto sobre la organogénesis (Liu et al., 2012).

El uso de AIB es ampliamente difundido en el cultivo de tejidos ya que no causa fitotoxicidad en un amplio rango de concentración y es eficiente en varios géneros y especies; mediante el uso de Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masa se ha demostrado que el AIB es un compuesto endógeno en varias especies de plantas, además se sabe que cuando se aplica exógenamente tiene diversos efectos sobre el crecimiento y desarrollo de las células vegetales, sin embargo se usa principalmente para la inducción de raíces adventicias (Hartmann & Kester, 2014).

Calcio y su interacción con las auxinas

El calcio (Ca^{2+}) participa en una multitud de procesos celulares esenciales, que van desde la división celular, el crecimiento y encogimiento celular, la secreción, la regulación transcripcional, la polaridad celular, la regulación de la apertura de los estomas, las respuestas a la luz, las respuestas al estrés biótico y abiótico, la inmunidad y las respuestas a múltiples hormonas vegetales, incluida la respuesta a las auxinas (Dodd et al., 2010; Hepler, 2005; Kudla et al., 2010).

El calcio es uno de los pocos nutrientes minerales que pueden influir notablemente en el enraizamiento; se ha demostrado que participa fundamentalmente en la división celular y en el proceso de elongación de los primordios de la raíz que se produce durante las últimas fases de enraizamiento; es importante comprender que la presencia de calcio en el medio de cultivo o sustrato es necesaria porque, a diferencia de otros elementos minerales su transporte basipetal es lento en el floema (Bellamine et al., 1998).

El primer registro de la relación del calcio con el transporte de auxinas fue documentado por De la Fuente & Leopold (1973) quienes mediante la aplicación de EDTA en hipocótilos de girasol removieron el calcio, magnesio, lantano y otros cationes monovalentes, posteriormente repusieron los cationes de forma gradual y observaron que el transporte basipetal de AIA fue recuperado mediante la sucesiva aplicación de soluciones con calcio.

El uso de auxinas en interacción con calcio se presenta como una alternativa para promover el crecimiento y división celular, por un lado el calcio al ser constituyente de la pared celular vegetal está relacionado con la formación de nuevas células y tejidos ya que actúa sobre la división celular y formación de la laminilla media, mientras las auxinas estimulan la formación de diversas estructuras principalmente de raíces secundarias, es importante

destacar que en la actualidad se ha demostrado la relación existente entre la rutas de las auxinas y las funciones de transporte del calcio dentro de la célula (Li et al., 2019; Marschner, 2011). Vanneste & Friml (2013) mediante una extensa revisión bibliográfica describen los posibles mecanismos subyacentes de la interconexión de Ca^{2+} y la señalización de las auxinas y sus roles fisiológicos y de desarrollo; sin embargo, mencionan que dicha señalización todavía es poco conocida, entre los mecanismos que se pueden destacar se encuentran los siguientes:

Aumento rápido y transitorio del Ca^{2+} citosólico después de la aplicación exógena de auxinas sintéticas y naturales.

Dependencia de la señalización del Ca^{2+} en las rutas de los receptores de auxinas.

El rol del Ca^{2+} en la regulación del pH y su relación con la acidificación del apoplasto durante la elongación por auxinas.

La dependencia del transporte de auxinas polares está mediada por la disponibilidad de Ca^{2+} .

Capítulo III

Metodología

Ubicación y Materiales del Experimento

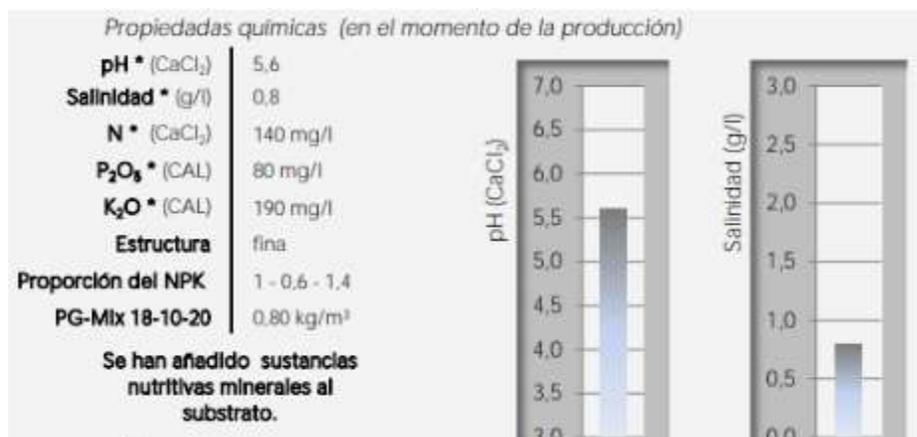
Agrobiotech es una empresa ubicada en Tumbaco - Ecuador que se dedica a la micropropagación a gran escala de múltiples especies de valor económico entre las cuales se encuentra la mora de Castilla sin espinas *Rubus glaucus* Benth, entre sus objetivos se encuentra aumentar la tasa de aclimatación y la calidad de las explantes para la venta.

La investigación de campo y laboratorio se llevó a cabo en las instalaciones de Agrobiotech, localizadas en la provincia de Pichincha, cantón Quito, parroquia Tumbaco ubicada a una altitud: de 2320 msnm, latitud: 0°11'10.9" S. y longitud: 78°22'49.0" O. Las condiciones del cuarto de crecimiento de laboratorio fueron temperatura constante de 20°C, fotoperiodo de 12 horas e irradiancia de 16,85 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ medidos con el Sensor de Flujo de Fotones PAR Marca Decagon modelo Modelos QSO-S.

Se utilizó recipientes plásticos de 200 ml como contenedor y recipientes de 150 ml como tapa. Se utilizó turba Floragard tipo Seed 1 (Figura 1) autoclavada a una presión de 120 psi durante 20 minutos. Se obtuvieron 9 soluciones resultantes de la combinación de los niveles de Cloruro de Calcio di hidratado con AIB (Tabla 1), por último, se procedió a autoclavar las soluciones a una presión de 120 psi durante 20 minutos. El material vegetal se obtuvo de la fase previa de multiplicación, se utilizaron un total de 45 explantes de *Rubus glaucus* Benth que posean una longitud de entre 30 mm a 35 mm y un mínimo de tres hojas (Vaca & Landázuri, 2013).

Figura 1

Datos técnicos de la turba



Nota. La turba utilizada fue Floragard tipo Seed 1 (Floragard, 2021)

Tabla 1

Tratamientos y niveles de los Factores

Tratamiento	AIB (mg L ⁻¹)	CaCl ₂ (mM)
T1	0	0
T2	0	1,5
T3	0	3
T4	1	0
T5	1	1,5
T6	1	3
T7	2	0
T8	2	1,5
T9	2	3

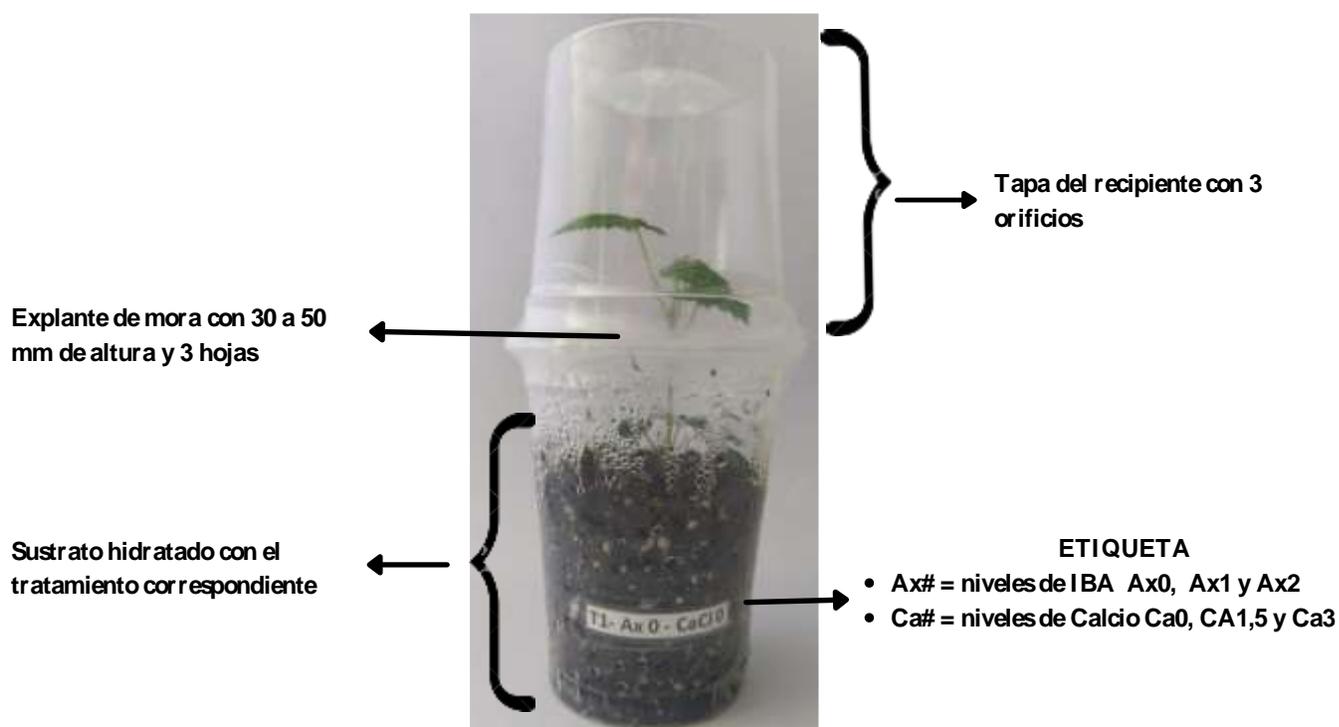
Manejo del experimento

Dentro de cámara de flujo laminar se procedió a etiquetar 45 recipientes plásticos (9 tratamientos por 5 repeticiones), en cada recipiente se mezclaron 20 g turba y 25 gramos de la solución enraizante del tratamiento correspondiente a la etiqueta (Zimmerman,1981). Se

introdujo de forma perpendicular $\frac{1}{4}$ de la base del explante dentro del medio de enraizamiento (turba hidratada con solución enraizante) y se selló. La unidad experimental estuvo constituida por un explante de *Rubus glaucus* Benth ubicado dentro del recipiente con el tratamiento de enraizamiento asignado (Figura 2).

Figura 2

Esquema de la unidad experimental



El 28 de enero se aleatorizaron los nueve tratamientos sobre las 45 unidades experimentales (tamaño de la muestra) como se describe en el Croquis experimental (Figura 9) y se ubicaron dentro del cuarto de crecimiento donde se mantuvieron cuatro semanas, a la semana tres se procedió a perforar la base y la tapa del recipiente (Figuras 3 y 4).

Figura 3

Vista Frontal del experimento

**Figura 4**

Vista lateral del experimento



Variables evaluadas

Fase Enraizamiento in vitro

Al cabo de cuatro semanas después de la introducción de las plántulas a la fase de enraizamiento se contabilizaron el número de explantes enraizados por tratamiento (Figura 5).

Una vez verificado el enraizamiento de las plántulas se procedió a ubicarlas en el cuarto de aclimatación.

Figura 5

Verificación de explantes enraizados



Fase Aclimatación post vitro

El proceso de aclimatación tuvo una duración de cuatro semanas, transcurrido este tiempo, se procedió a verificar el número de plántulas viables por tratamiento.

Variables Morfométricas

La cantidad de raíces y hojas se contabilizó manualmente, se tomó en cuenta como raíces todas aquellas que surgían desde el tallo de la plántula. La longitud de la raíz se midió en centímetros (cm) mediante el uso de papel milimetrado, se tomó en cuenta la longitud desde el cuello (unión de la raíz y el tallo) hasta el extremo más largo, la longitud del tallo se midió desde el cuello hasta el ápice de la plántula (Figura 7).

Figura 6

Toma de medidas del tallo y raíces de las plántulas



Peso Fresco y Materia Seca

El peso fresco se pesó en gramos (mg) mediante el uso de una balanza analítica. La zona radicular fue separada del área foliar y se procedió a pesar. Las secciones fueron colocadas por separado en bolsas de papel etiquetadas para secarlas en horno a una temperatura constante de 120°C durante 12 horas y posteriormente con una balanza analítica se realizó el pesaje de la masa seca de la raíz y de la zona área.

Diseño experimental y análisis de datos

El experimento se dispuso bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA) en arreglo bifactorial 3x3 con 5 repeticiones (Figura 7), cuyo modelo matemático fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_j + A_k + CaA_{jk} + e_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijkl} = variable medida

μ = media general

Ca_j = Efecto de la j-ésima concentración de calcio

A_k = Efecto de la k-ésima concentración de AIB

CaA_{jk} = Efecto de la interacción concentración de Calcio * concentración de AIB

e_{ijkl} = Error experimental

Las variables morfométricas, el peso fresco y la materia seca se caracterizaron mediante estadística descriptiva (media y error estándar). Las variables se analizaron mediante un análisis de varianza utilizando modelos lineales generales y mixtos, además se aplicó la función varident para los niveles de calcio. Las variables y sus respectivas interacciones se analizaron por pruebas de comparación de medias LSD al 5%. Todos los análisis fueron realizados mediante el software estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2017).

Figura 7

Croquis Experimental

Ax2 - Ca0	Ax0 - Ca1,5	Ax0 - Ca3	Ax0 - Ca0	Ax1 - Ca0
Ax0 - Ca1,5	Ax0 - Ca1,5	Ax2 - Ca3	Ax1 - Ca1,5	Ax1 - Ca1,5
Ax1 - Ca3	Ax2 - Ca0	Ax0 - Ca0	Ax2 - Ca1,5	Ax2 - Ca1,5
Ax2 - Ca1,5	Ax0 - Ca3	Ax1 - Ca1,5	Ax0 - Ca3	Ax1 - Ca3
Ax1 - Ca0	Ax2 - Ca3	Ax0 - Ca0	Ax2 - Ca0	Ax1 - Ca1,5
Ax1 - Ca3	Ax1 - Ca3	Ax0 - Ca3	Ax2 - Ca3	Ax0 - Ca1,5
Ax2 - Ca1,5	Ax1 - Ca0	Ax1 - Ca0	Ax0 - Ca3	Ax0 - Ca0
Ax2 - Ca3	Ax0 - Ca1,5	Ax2 - Ca0	Ax1 - Ca0	Ax2 - Ca1,5
Ax1 - Ca3	Ax1 - Ca1,5	Ax2 - Ca3	Ax2 - Ca0	Ax0 - Ca0

Nota Ax0, Ax1 y Ax3 representan los niveles de AIB; y Ca0, Ca1,5 y Ca3 representan los niveles de CaCl₂ 2H₂O

Análisis Económico

Debido a la naturaleza de los resultados del experimento se decidió adaptar el análisis de presupuesto parcial propuesto por Perrin, (1983) y el modelo de margen bruto descrito por Pozoga et al, (2019) y adaptado de Elum et al, (2017). Se actualizaron los precios del Cloruro de Calcio y del AIB mediante proforma (Tabla 2) y estos costos se utilizaron para el cálculo respectivo de los costos variables para cada tratamiento, considerando un total de 25 g de solución por plántula, para el beneficio bruto por tratamiento se tomó en cuenta como unidad productiva un lote de 2000 plantas/has, finalmente para obtener los beneficios netos por tratamiento se le resta el beneficio bruto de los costos variables totales.

La fórmula del porcentaje de margen bruto se describe a continuación:

$$\%MBB = \frac{BB - CVT}{BB} \times 100$$

Donde:

%MBB = Margen de beneficio Bruto

BB = Beneficio Bruto

CVT = Costos variables totales por lotes de tratamiento

Tabla 2

Precios y presentaciones del AIB al 98% y el Cloruro de Calcio Dihidratado (CaCl₂ · 2 H₂O), transformados a \$/mg de cada reactivo.

Reactivo	Presentación Gramos	Precio	Precio (\$/mg)
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	500	50,4	0,0001008
IBA	25	27,53	0,001101184

Capítulo IV

Resultados y Discusión

Resultados

Las 45 plántulas evaluadas presentaron formación de raíces y se aclimataron.

Variables Morfométricas

No se encontró un efecto significativo de la interacción $\text{CaCl}_2 \times \text{AIB}$ para ninguna de las variables morfométricas evaluadas. Sin embargo, se encontró un efecto significativo de los niveles de AIB sobre longitud del tallo ($F= 0.85$; $p=0.0464$) y el número de hojas ($F= 4.66$; 0.0159 ; Tabla 3). Las plántulas tratadas con 0 mg L^{-1} de AIB presentaron mayor longitud del tallo que las tratadas con 2 mg L^{-1} y las plántulas tratadas con el 1 mg L^{-1} de AIB presentaron mayor número de hojas que el resto de las plántulas (Tabla 4; Figura 8).

Tabla 3

ANAVA de las variables morfométricas de plántulas in vitro de Rubus glaucus Beth tratadas con diferentes combinaciones de CaCl_2 y AIB

Fuente de Variación	GI	Longitud del tallo (cm)	Número de Hojas	Longitud raíces (cm)	Número de raíces
CaCl_2	2	$p = 0.2882$	$p = 0.3597$	$p = 0.4913$	$p = 0.9937$
IBA	2	$p = 0.0464$	$p = 0.0159$	$p = 0.7321$	$p = 0.2201$
$\text{CaCl}_2 \times \text{IBA}$	4	$p = 0.0788$	$p = 0.5058$	$p = 0.1208$	$p = 0.2308$

Tabla 4

Promedio \pm error estándar de las variables morfológicas de plántulas in vitro de Rubus glaucus Beth tratadas con diferentes dosis de AIB.

Niveles de AIB	Longitud del tallo (cm)	Número de Hojas	Longitud raíces (cm)	Número de raíces
0 mg L ⁻¹	9.09 \pm 0.66 a	11.33 \pm 1.92 b	8.07 \pm 2.42 a	3.33 \pm 2.35 a
1 mg L ⁻¹	7.17 \pm 0.48 ab	12.53 \pm 1.10 a	7.86 \pm 2.39 a	2.80 \pm 0.86 a
2 mg L ⁻¹	7.77 \pm 0.57 b	11.07 \pm 1.52 b	7.41 \pm 2.39 a	4.13 \pm 2.50 a

Figura 8

Altura y número de hojas de plántulas Rubus glaucus Beth tratadas con diferentes niveles de AIB.



Nota. Niveles de AIB: a) 0 mg L⁻¹, b) 1 mg L⁻¹, c) 2 mg L⁻¹

Peso fresco y Materia Seca

No se encontró un efecto significativo de la interacción $\text{CaCl}_2 \times \text{AIB}$, sobre el peso fresco y materia seca de plántulas in vitro de *Rubus glaucus* Beth (Tabla 5); sin embargo, las plántulas no tratadas con CaCl_2 y AIB tendieron a presentar mayor materia seca que el resto de las plántulas (Tabla 6).

Tabla 5

ANAVA del peso fresco y materia seca de plántulas in vitro de Rubus glaucus Beth tratadas con diferentes combinaciones de CaCl_2 y AIB

Fuente de Variación	GI	Peso Fresco tallo y hojas (mg)	Materia Seca tallo y hojas (mg)	Peso fresco Raíz (mg)	Materia Seca Raíz (mg)	Peso fresco total (mg)	Materia seca total (mg)
CaCl_2	2	$p = 0.6211$	$p = 0.6077$	$p = 0.7675$	$p = 0.9799$	$p = 0.7435$	$p = 0.6689$
IBA	2	$p = 0.0969$	$p = 0.0738$	$p = 0.0921$	$p = 0.1148$	$p = 0.1158$	$p = 0.0761$
$\text{CaCl}_2 \times \text{IBA}$	4	$p = 0.0708$	$p = 0.0592$	$p = 0.4876$	$p = 0.4499$	$p = 0.1015$	$p = 0.0722$

Tabla 6

Promedio \pm error estándar de la materia seca de plantulas Invitro de Rubus glaucus Benth aclimatadas y enraizadas en diferentes combinaciones de AIB y CaCl_2 .

Tratamiento	Materia seca parte aérea (mg)	Materia seca raíz (mg)	Materia Seca total (mg)
T1 (0 mg L ⁻¹ AIB + 0,0 mM CaCl_2)	75,94 \pm 15,54	7 \pm 1,33	82,94 \pm 15,91
T2 (0 mg L ⁻¹ AIB + 1,5 mM CaCl_2)	39,52 \pm 17,14	4,98 \pm 2,53	44,5 \pm 19,53
T3 (0 mg L ⁻¹ AIB + 3,0 mM CaCl_2)	64,76 \pm 26,56	6,8 \pm 3,13	71,56 \pm 29,65
T4 (1 mg L ⁻¹ AIB + 0,0 mM CaCl_2)	34,54 \pm 12,64	4,28 \pm 1,54	38,82 \pm 13,65
T5 (1 mg L ⁻¹ AIB + 1,5 mM CaCl_2)	42,06 \pm 7,97	4,92 \pm 1,14	46,98 \pm 8,81
T6 (1 mg L ⁻¹ AIB + 3,0 mM CaCl_2)	50,46 \pm 26,11	5,32 \pm 1,95	55,78 \pm 28,03
T7 (2 mg L ⁻¹ AIB + 0,0 mM CaCl_2)	54,5 \pm 27,33	6,24 \pm 2,85	60,74 \pm 29,76
T8 (2 mg L ⁻¹ AIB + 1,5 mM CaCl_2)	62,74 \pm 30,51	7,76 \pm 4,21	70,5 \pm 34,62
T9 (2 mg L ⁻¹ AIB + 3,0 mM CaCl_2)	47,66 \pm 13,45	5,86 \pm 0,87	53,52 \pm 14,02

Análisis Económico

El análisis de presupuesto parcial es una metodología desarrollada para investigaciones agrícolas que tiene como finalidad identificar los tratamientos que presenten una diferencia significativa en el rendimiento del cultivo por unidad productiva ($\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) y que al mismo tiempo generen un mejor retorno económico ($\text{\$} \cdot \text{ha}^{-1}$), esta metodología toma en cuenta las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y la diferencia de los costos variables generados por cada tratamiento (Perrin, 1983). Elum et al, (2017) define el margen de beneficio bruto como la diferencia entre los ingresos y los costos variables asociados con la producción del cultivo dividido por los ingresos y expresado como porcentaje. El análisis costos variables se llevó a cabo considerando un lote de 2000 plántulas llevadas a aclimatación este valor se extrapolo a plantas por hectárea y se consideró un precio de venta de 1,00 \$ por plántula para calcular los costos variables, los benéficos brutos y los beneficios netos (Tabla 7).

Tabla 7

Análisis de Costos variables y margen bruto para los nueve tratamientos considerando un lote de 2000 plántulas introducidas a climatización.

Tratamiento	Costos Variables (\$/ha)	Beneficio Bruto (\$/ha)	Beneficio Neto (\$/ha)	% Margen Bruto
T1 (0 mg L ⁻¹ AIB + 0,0 mM CaCl ₂)	0,00	2000	2000,00	100,000%
T2 (0 mg L ⁻¹ AIB + 1,5 mM CaCl ₂)	1,55	2000	1998,45	99,922%
T3 (0 mg L ⁻¹ AIB + 3,0 mM CaCl ₂)	3,10	2000	1996,90	99,845%
T4 (1 mg L ⁻¹ AIB + 0,0 mM CaCl ₂)	0,08	2000	1999,92	99,996%
T5 (1 mg L ⁻¹ AIB + 1,5 mM CaCl ₂)	1,63	2000	1998,37	99,918%
T6 (1 mg L ⁻¹ AIB + 3,0 mM CaCl ₂)	3,18	2000	1996,82	99,841%
T7 (2 mg L ⁻¹ AIB + 0,0 mM CaCl ₂)	0,15	2000	1999,85	99,992%
T8 (2 mg L ⁻¹ AIB + 1,5 mM CaCl ₂)	1,71	2000	1998,29	99,915%
T9 (2 mg L ⁻¹ AIB + 3,0 mM CaCl ₂)	3,26	2000	1996,7412	99,837%

Discusión

Enraizamiento y Aclimatación

Las dos últimas fases de la micropropagación son críticas para la supervivencia y obtención de plántulas, la formación de raíces *in vitro* depende tanto de las condiciones genéticas y fisiológicas, como de condiciones lumínicas, uso de hormonas y/o reguladores de crecimiento y variación en la concentración de macro y micronutrientes (Hartmann & Kester, 2014). La transición de las plántulas micropropagadas de condiciones *in vitro* a *ex vitro* está limitada principalmente por la poca capacidad de retención de agua, esta característica es propia de las plántulas desarrolladas *in vitro*, la rápida pérdida de agua en condiciones *ex vitro* está ligada al malfuncionamiento de los estomas (Santamaria & Kerstiens, 1994).

Las plantas desarrolladas en condiciones normales (*ex vitro*) son autotróficas es decir que a través de la fotosíntesis son capaces de utilizar sustancias inorgánicas para producir compuestos orgánicos que su vez usan como fuente de energía o para procesos metabólicos, por otra parte, las plántulas *in vitro* son heterotróficas o mixotróficas esto quiere decir que tienen dependencia total o parcial de fuente externas de hidrato de carbono para energía y de compuestos orgánicos; la aclimatación se caracteriza por una transición forzada hacia la autotrofia (Kozai, 1991).

Las plántulas enraizadas *in vitro* de ciertas especies de la familia Rosaceae (manzana y rosa) presentan mayor crecimiento y tasas de supervivencia durante la fase de aclimatación a comparación de las plántulas enraizadas *ex vitro*, esto demuestra la importancia de la formación de nuevas raíces para reponer la pérdida de agua debido a las anomalías fisiológicas de la hoja que se corrigen durante la fase de aclimatación (De Klerk, 2002).

En base a la revisión de literatura realizada en la presente investigación este es el primer reporte de enraizamiento in vitro y aclimatación de plántulas de *Rubus glaucus* Beth sin espinas en ausencia de AIB y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Fira et al, (2012) reportó el enraizamiento y aclimatación de plántulas micropropagadas de *Rubus fruticosus* en varios sustratos a los cuales únicamente se les adicionó agua, de manera similar Clapa et al, (2013) enraizaron y aclimataron plántulas micropropagadas de varias especies y variedades de la familia *Roseae* y del género *Rubus* sin adición de nutrientes ni hormonas de enraizamiento. Vaca & Landázuri, (2013) sugieren que el uso de medios y soluciones nutritivas con altas concentraciones de sales minerales durante la fase de enraizamiento tienden a generar estrés sobre las plántulas micropropagas de *Rubus glaucus* Beth sin espinas.

Variables Morfométricas, Peso Fresco y Materia seca

El uso de dosis de AIB incidió sobre la longitud del tallo y el número de hojas; la longitud de tallo de las plántulas tratadas con 0 mg L^{-1} AIB fue un 17.82 % mayor respecto a las tratadas con 1 mg L^{-1} AIB y 2 mg L^{-1} AIB y a su vez las plántulas tratadas con 1 mg L^{-1} AIB presentaron 1,33 hojas más respecto a las tratadas con 0 mg L^{-1} AIB y 2 mg L^{-1} AIB. Fathy et al, (2018) durante la fase enraizamiento in vitro de explantes de *Rubus fruticosus* obtuvieron resultados similares, observando 12 hojas por plántula y una mayor altura de tallo en los explantes tratados con $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB y una concentración del 25% de sales de MS en el medio.

En el presente ensayo no se observó incidencia del AIB sobre la longitud y número de raíces de explantes enraizados in vitro de *Rubus glaucus* Bent *sin espinas*, sin embargo Cancino-Escalante et al, (2015) encontró un efecto significativo de los tres niveles de AIB (0 , 1 y 2 mg L^{-1} de AIB) sobre el número de raíces y la longitud de la raíz de explantes enraizados in vitro de *Rubus glaucus* Benth; sugerimos que esta discordancia se puede deber al reemplazo de medios gelificados por sustrato.

El presente ensayo no mostró diferencias significativas de la interacción del CaCl_2 y AIB sobre la materia seca de las plántulas micropropagadas de *Rubus glaucus* Benth, sin embargo, contrario a lo esperado las plántulas del T1 ($0 \text{ mg L}^{-1}\text{AIB} + 0 \text{ mM CaCl}_2$) se destacaron del resto de tratamientos al presentar diferencias numéricas. Este fenómeno se aduce a la posible producción y acumulación de etileno durante la fase de enraizamiento in vitro. Lau & Yang, (1974) y Kalra & Bhatla, (1998) en sus estudio del efecto sinérgico del calcio y la kinetina sobre la producción de etileno en el hipocótilo de frijol mungo y Kalra & Bhatla, (1998) respecto a la interacción Auxina - Calcio en la formación de raíces adventicias en explantes de hipocótilo de Girasol respectivamente, demostraron que la interacción de auxinas con fuentes de calcio favorece una mayor producción del etileno; además observaron que al quelatar el Ca^{2+} con EDTA o EGTA (un quelante con mayor afinad por el Ca^{2+} que el EDTA) la síntesis del etileno disminuye y aumenta la sensibilidad de los tejidos al efecto de las auxinas. Podwyszyńska & Goszczyńska, (1998) demostraron que la presencia de AIA en el medio de enraizamiento in vitro de explantes de Rosa "Starina" favorece la síntesis y una acumulación de etileno en los recipientes respecto a los medios sin adición de AIA.

Análisis económico

El porcentaje de plántulas aclimatadas por tratamiento en el presente ensayo fue del 100%, por este motivo no se pudo aplicar en totalidad los principios del análisis de presupuesto parcial, sin embargo, mediante el margen de beneficio bruto se pudo determinar que el del T1 ($0 \text{ mg L}^{-1}\text{AIB} + 0 \text{ mM CaCl}_2$) genera un ahorro respecto a cualquier tratamiento ya que permite la aclimatación de las plántulas sin el uso del AIB y el CaCl_2 .

Capítulo V

Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

El enraizamiento y la aclimatación de plántulas de mora de Castilla sin espinas *Rubus glaucus Benth* se pueden efectuar en ausencia de sales de cloruro de calcio y AIB.

Las plántulas no tratadas con AIB presentaron la mayor longitud de tallo, además entre los tratamientos destaco el T1 (0 mg L⁻¹AIB + 0 mM CaCl₂) con una longitud de tallo 11,3 ± 20 cm y una diferencia numérica de materia seca respecto al resto de tratamientos.

El T1 (0 L⁻¹ AIB + 0 mM CaCl₂) obtuvo el mejor Margen de Beneficio Bruto respecto al resto de tratamientos, además represento un ahorro de 1,63 \$ por cada 2000 plántulas introducidas a la fase de aclimatación respecto al tratamiento utilizado por la empresa T5 (1 mg L⁻¹ AIB + 1,5 mM CaCl₂).

Recomendaciones

El presente ensayo recomienda a la empresa Agrobiotech implementar el tratamiento T1 (0 mg L⁻¹AIB + 0 mM CaCl₂) para obtener 100 % de enraizamiento y aclimatación junto con un un mayor tamaño de las plántulas micropropagadas *Rubus glaucus Benth*, además de representar un ahorro en reactivos para la empresa.

Se recomienda el uso de pruebas moleculares para comprobar la movilidad de auxinas y Ca²⁺ en el cultivo in vitro de *Rubus glaucus Benth*.

Se recomienda el uso alternativo de AIA, y diferentes ácidos inductores como factor de enraizamiento.

Se recomienda utilizar métodos que permitan cuantificar la síntesis y acumulación de etileno en durante las diferentes fases de la micro propagación de *Rubus glaucus Benth*.

Bibliografía

- Andrade, A., Gómez, L., Torres, Y., & Aguilera-Arango, G. (2021). Evaluación De Medios De Cultivo Para El Establecimiento, Multiplicación Y Enraizamiento In Vitro De Mora (*Rubus Glaucus* Benth.). *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 37(2), 117–127.
<http://revistas.udec.cl/index.php/chjaas/article/view/5229>
- Bartel, B., LeClere, S., Magidin, M., & Zolman, B. K. (2001). Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: De novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid β -oxidation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20(3), 198–216.
<https://doi.org/10.1007/s003440010025>
- Bates, G. W., & Goldsmith, M. H. M. (1983). Rapid response of the plasma-membrane potential in oat coleoptiles to auxin and other weak acids. *Planta*, 159(3), 231–237.
<https://doi.org/10.1007/BF00397530>
- Bellamine, J., Penel, C., Greppin, H., & Gaspar, T. (1998). Confirmation of the role of auxin and calcium in the late phases of adventitious root formation. *Plant Growth Regulation*, 26(3), 191–194. <https://doi.org/10.1023/A:1006182801823>
- Bhalerao, R. P., Eklöf, J., Ljung, K., Marchant, A., Bennett, M., & Sandberg, G. (2002). Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Journal*, 29(3), 325–332. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01217.x>
- Blommaert, K. L. J. (1954). Growth- and Inhibiting-Substances in Relation to the Rest Period of the Potato Tuber. *Nature*, 174(4438), 970–972. <https://doi.org/10.1038/174970b0>
- Bobrowski, V., Mello-Farias, P., & Peters, J. (1996). Micropropagation of blackberries (*rubus* sp.) Cultivars. *Revista Brasileira de Agrociência*, 2(1).
<https://doi.org/10.18539/cast.v2i1.146>
- Cancino-Escalante, G. O., Quevedo García, E., Villamizar, C. E., & Díaz Carvajal, C. (2015). Propagación in vitro de materiales seleccionados de *Rubus glaucus* Benth (mora de

- Castilla) en la provincia de Pamplona, región nororiental de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 7–15. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54262>
- Clapa, D., Fira, A., & Joshee, N. (2013). An efficient ex vitro rooting and acclimatization method for horticultural plants using float hydroculture. *HortScience*, 48(9), 1159–1167. <https://doi.org/10.21273/hortsci.48.9.1159>
- Clapa, D., Fira, A., Joshee, N., Fira, A., & Clapa, D. (2009). Ex-Vitro Acclimation of some Horticultural Species in Hydroculture. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture*, 66(1), 44-50–50. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-hort:3782>
- Clapa, D., Fira, A., & Simu, M. (2015). The Role of Rooting Substrate in Blackberry ex Vitro Rooting and Acclimatization Stage. *ProEnvironment/ProMediu*, 8(22). <http://journals.usamvcluj.ro/index.php/promediu>
- Davies, P. J. (1995). *Plant Hormones* (P. J. Davies (ed.)). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-0473-9>
- De Klerk, G. J. (2002). Rooting of microcuttings: Theory and practice. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 38(5), 415–422. <https://doi.org/10.1079/IVP2002335>
- Debergh, P. C. (1991). Acclimatization Techniques Of Plants From In Vitro. *Acta Horticulturae*, 289, 291–300. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1991.289.77>
- dela Fuente, R. K., & Leopold, A. C. (1973). A Role for Calcium in Auxin Transport. *Plant Physiology*, 51(5), 845–847. <https://doi.org/10.1104/pp.51.5.845>
- Di Rienzo, J. A., Macciavelli, R. E., & Casanoves, F. (2017). *Modelos Lineales Generalizados Mixtos: aplicaciones en InfoStat* (Issue July). <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/8691?locale-attribute=es>
- Dindas, J., Scherzer, S., Roelfsema, M. R. G., Von Meyer, K., Müller, H. M., Al-Rasheid, K. A. S., Palme, K., Dietrich, P., Becker, D., Bennett, M. J., & Hedrich, R. (2018). AUX1-mediated root hair auxin influx governs SCFTIR1/AFB-type Ca²⁺ signaling. *Nature*

- Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03582-5>
- Dodd, A. N., Kudla, J., & Sanders, D. (2010). The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 593–620. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070109-104628>
- Donnelly, D. J., & Daubeny, H. A. (1986). Tissue Culture of Rubus Species. *Acta Horticulturae*, 183, 305–314. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1986.183.44>
- Elum, Z. A., Etowa, E. B., & Ogonda, A. U. (2017). Economics of cucumber production in Rivers State, Nigeria. *Agro-Science*, 15(2), 48. <https://doi.org/10.4314/as.v15i2.7>
- Epstein, E., & Ludwig-Müller, J. (1993). Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport. *Physiologia Plantarum*, 88(2), 382–389. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb05513.x>
- Fathy, H. M., El-leel, O. F. A., & Amin, M. A. (2018). Micropropagation and Biomass Production of Rubus fruticosus L . (Blackberry) plant. *Curreweb.Com*, 8(4), 1215–1228. <http://www.curreweb.com/mejas/mejas/2018/1215-1228.pdf>
- Finne, Å. (1986). Micropropagation of Rubus spp. *Agricultural and Food Science*, 58(4), 193–196. <https://doi.org/10.23986/afsci.72232>
- Fira, A., Clapa, D., & Vescan, L. A. (2012). Direct ex vitro rooting and acclimation in blackberry cultivar “Loch Ness”. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca - Animal Science and Biotechnologies*, 69(1–2), 247–254. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-asb:69:1-2:8492>
- Floragard. (2021). *Florabalt Seed 1*. <https://professional.floragard.de/es-es/gartenbau/suchergebnis/substratos-premium-substratos-de-cultivo/475/florabalt-seed-1>
- Gaspar, T., Keveks, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., & Thorpe, T. A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* (Vol. 32, Issue 4, pp. 272–289). Springer. <https://doi.org/10.1007/BF02822700>
- Graham, J., & Woodhead, M. (2011). Rubus. In *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding*

Resources: Temperate Fruits (pp. 179–196). Springer, Berlin, Heidelberg.

https://doi.org/10.1007/978-3-642-16057-8_9

Hartmann, H. T., & Kester, D. E. (2014). *Hartmann & Kester's Plant Propagation Principles and Practices*. Pearson Education Limited. <https://www.pearson.com/us/higher-education/program/Davies-Hartmann-Kester-s-Plant-Propagation-Principles-and-Practices-9th-Edition/PGM334328.html>

Hepler, P. K. (2005). Calcium: A central regulator of plant growth and development. In *Plant Cell* (Vol. 17, Issue 8, pp. 2142–2155). Oxford Academic.

<https://doi.org/10.1105/tpc.105.032508>

Imaseki, H. (1999). Chapter 9 Control of ethylene synthesis and metabolism. In *New Comprehensive Biochemistry* (Vol. 33, Issue C, pp. 209–245). Elsevier.

[https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(08\)60489-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(08)60489-5)

INIAP. (2016). *El Cultivo de Mora en el Ecuador* (p. 102).

<http://181.112.143.123/bitstream/41000/2827/1/iniapsc322est.pdf>

Jennings, D. L. (1988). Raspberries and blackberries: their breeding, diseases and growth. In *Fruit Breeding*.

<http://www.cabi.org/isc/default.aspx?site=144&page=2540&LoadModule11=CABISEARCHRESULTS&LoadAction=LoadAbstract&term=do:%22Raspberries+and+blackberries:+their+breeding,+diseases+and+growth.%22&AbstractSearchTerm=do:%22Raspberries+and+blackberries:+their+br>

Jennings, D. L., Daubeny, H. A., & Moore, J. N. (1991). Blackberries and Raspberries (*Rubus*). *Acta Horticulturae*, 290, 331–392. <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.1991.290.8>

Kalra, G., & Bhatla, S. C. (1998). Auxin-calcium interaction in adventitious root formation in the hypocotyl explants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 7(2), 107–110. <https://doi.org/10.1007/BF03263045>

Kozai, T. (1991). *Acclimatization of Micropropagated Plants* (pp. 127–141). Springer, Berlin,

- Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-76415-8_8
- Kudla, J., Batistič, O., & Hashimoto, K. (2010). Calcium signals: The Lead Currency of plant information processing. In *Plant Cell* (Vol. 22, Issue 3, pp. 541–563). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072686>
- Lau, O. lim, & Yang, S. F. (1974). Synergistic effect of calcium and kinetin on ethylene production by the mungbean hypocotyl. *Planta*, *118*(1), 1–6.
<https://doi.org/10.1007/BF00390497>
- León, J. . (2000). *Botánica de los cultivos tropicales*. Editorial Agroamérica, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
http://books.google.com.co/books?id=B-3ITXx9DysC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Li, T., Yan, A., Bhatia, N., Altinok, A., Afik, E., Durand-Smet, P., Tarr, P. T., Schroeder, J. I., Heisler, M. G., & Meyerowitz, E. M. (2019). Calcium signals are necessary to establish auxin transporter polarity in a plant stem cell niche. *Nature Communications*, *10*(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08575-6>
- Liu, X., Barkawi, L., Gardner, G., & Cohen, J. D. (2012). Transport of indole-3-butyric acid and indole-3-acetic acid in Arabidopsis hypocotyls using stable isotope labeling. *Plant Physiology*, *158*(4), 1988–2000. <https://doi.org/10.1104/pp.111.191288>
- Ludwig-Müller, J. (2000). Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regulation*, *32*(2–3), 219–230. <https://doi.org/10.1023/A:1010746806891>
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P. J., Bennett, M., & Sandberg, G. (2002). AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the Arabidopsis seedling. *Plant Cell*, *14*(3), 589–597.
<https://doi.org/10.1105/tpc.010354>
- Marschner, P. (2011). Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition. In

Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition. Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/C2009-0-63043-9>

Marulanda, M. L., Carvajalino, M., & Vento, H. (2000). Establecimiento y multiplicación in vitro de plantas seleccionadas de *Rubus glaucus* Benth para el departamento de Risaralda (Colombia). In *Actual Biol* (Vol. 22, Issue 73, pp. 121–129).

<https://revistas.udea.edu.co/index.php/actbio/article/view/329625>

Marulanda, M. L., & Lopez, A. M. (2009). Characterization of Thornless *Rubus glaucus* in Colombia. *Canadian Journal of Pure & Applied Sciences*, 3(3), 875–885.

Marulanda, M. L., López, A. M., & Aguilar, S. B. (2007). Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 7(3), 242–252. <https://doi.org/10.12702/1984-7033.v07n03a03>

McAinsh, M. R., & Pittman, J. K. (2009). Shaping the calcium signature. *The New Phytologist*, 181(2), 275–294. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2008.02682.X>

McPheeters, K. D., Skirvin, R. M., & Hall, H. K. (1988). *Brambles (Rubus spp.)* (pp. 104–123). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-73520-2_3

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.

<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Najaf-Abadi, A. J., & Hamidoghli, Y. (2009). Micropropagation of thornless trailing blackberry (*Rubus* sp.) by axillary bud explants. *Australian Journal of Crop Science*, 3(4), 191–194.

<https://search.informit.org/doi/abs/10.3316/informit.037509152756777>

Nordström, A. C., Jacobs, F. A., & Efiasson, L. (1991). Effect of exogenous indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid on internal levels of the respective auxins and their conjugation with aspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings. *Plant Physiology*, 96(3), 856–861. <https://doi.org/10.1104/pp.96.3.856>

Perrin, R., Winkelmann, D., Moscardi, E., & Anderson, J. (1983). *La formulación de*

recomendaciones a partir de datos agronómicos.

<https://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/1063/9031.pdf>

Podwyszyńska, M., & Goszczyńska, D. M. (1998). Effect of inhibitors of ethylene biosynthesis and action, as well as calcium and magnesium on rose shoot rooting, shoot-tip necrosis and leaf senescence in vitro. *Acta Physiologiae Plantarum*, 20(1), 91–98.

<https://doi.org/10.1007/s11738-998-0049-6>

Pospíšilová, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D., & Plzánková, Š. (1999). Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. In *Biologia Plantarum* (Vol. 42, Issue 4, pp. 481–497). Springer. <https://doi.org/10.1023/A:1002688208758>

Pozoga, M., Olewnicki, D., & Jabłońska, L. (2019). In vitro propagation protocols and variable cost comparison in commercial production for *Paulownia tomentosa* × *Paulownia fortunei* hybrid as a renewable energy source. *Applied Sciences (Switzerland)*, 9(11).

<https://doi.org/10.3390/app9112272>

Rohr, R., Iliev, I., Scaltsoyiannes, A., & Tsoulpha, P. (2003). Acclimatization of micropropagated forest trees. *Acta Horticulturae*, 616, 59–69. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.616.3>

Santamaria, J. M., & Kerstiens, G. (1994). The lack of control of water loss in micropropagated plants is not related to poor cuticle development. *Physiologia Plantarum*, 91(2), 191–195.

<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb00418.x>

Smith, R. S.-. (1984). Red Raspberry Virus Diseases in North America. *Plant Disease*, 68(1), 274. <https://doi.org/10.1094/pd-68-274>

Sutter, E. G., & Cohen, J. D. (1992). Measurement of indolebutyric acid in plant tissues by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry analysis. *Plant Physiology*, 99(4), 1719–1722. <https://doi.org/10.1104/pp.99.4.1719>

Swarup, R., & Péret, B. (2012). AUX/LAX family of auxin influx carriers-An overview. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 3, Issue OCT, p. 225). Frontiers Research Foundation.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00225>

- Vaca, I., & Landázuri, P. (2013). Evaluación de tres niveles de nitrógeno en medio cultivo, en las fases de enraizamiento in vitro y adaptación a sustrato de *Rubus glaucus* (BENTH). *La Granja*, 18(2), 48. <https://doi.org/10.17163/lgr.n18.2013.04>
- Vanneste, S., & Friml, J. (2009). Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. *Cell*, 136(6), 1005–1016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.001>
- Vanneste, S., & Friml, J. (2013). Calcium: The missing link in auxin action. In *Plants* (Vol. 2, Issue 4, pp. 650–675). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/plants2040650>
- Villa, F., Pasqual, M., Araújo, A. G. de, & Pio, L. A. S. (2006). Micropropagação da amoreira-preta (*Rubus* spp.) e efeito de substratos na aclimatização de plântulas. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 28(1), 47–53. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v28i1.1302>
- Zimmerman, R. H. (1981). Micropropagation of Fruit Plants. *Acta Horticulturae*, 120, 217–222. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1981.120.29>

Enlace:

<https://drive.google.com/drive/folders/1kw7wA6DmJDQIDSBMd3XaXZotUAivOMKD?usp=sharing>