



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



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 de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

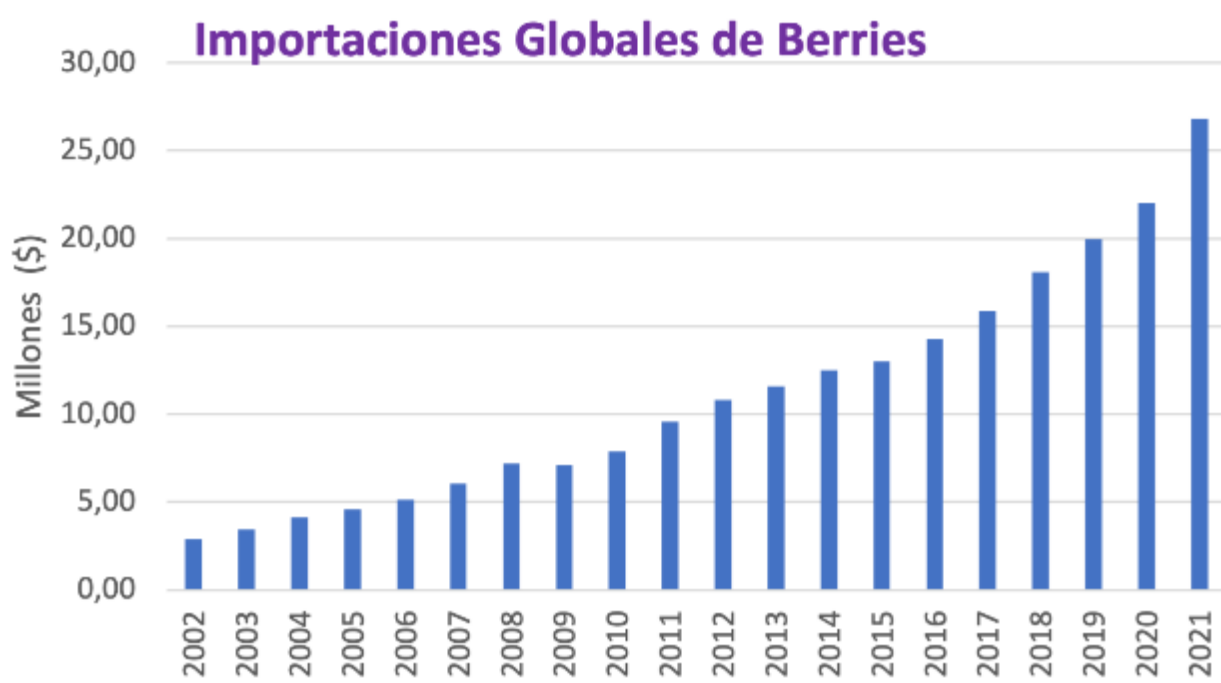
Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario

Ing. Landázuri Abarca, Pablo Aníbal Mgtr.

4 de julio de 2022



INTRODUCCIÓN



Fuente: Elaboración propia con datos de trademap.org



- Variedad sin espinas: Reducción de costos operativos
- 5000 ha y actividad principal de alrededor de 15000 pequeños y medianos agricultores
- **Dificultad de Enraizamiento y Aclimatación**

Fuente: Marulanda & Lopez, (2009); León, (2000)

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.



REVISIÓN DE LA LITERATURA



Mora de Castilla sin espinas (*Rubus glaucus* Benth)

Familia: *Rosaceae*

Género: *Rubus*

- Se produce sobre los 800 msnm
- Gluacus = tallos jóvenes y el revés de las hojas están cubiertos de una cera blanquecina
- La ausencia de espinas característica monogénica controlada por un gen recesivo.

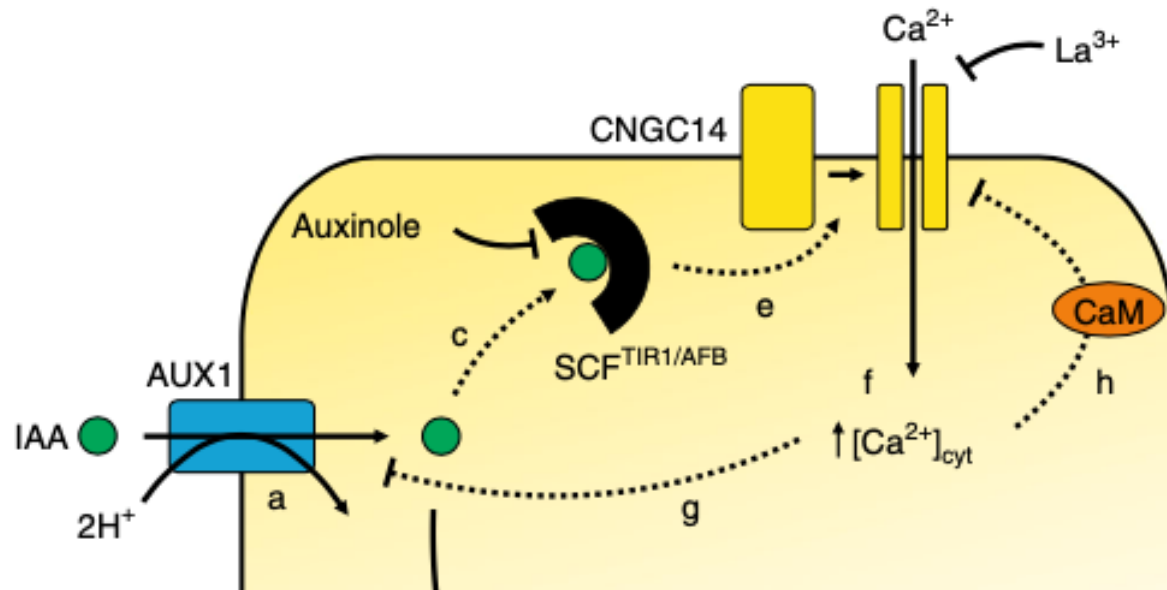
REVISIÓN DE LA LITERATURA

Micropropagación 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
- Plantas genéticamente homogéneas, altamente productivas y sanas.
- El primer trabajo de propagación in vitro de mora de castilla *Rubus glaucus* Benth fue realizado por Marulanda et al. (2000)
- La fase de aclimatación requiere del desarrollo de un conjunto de métodos y técnicas específicas para la especie en investigación (Debergh, 1991)

REVISIÓN DE LA LITERATURA



AIB

- 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 Acido Indol butírico (AIB).

AIB x $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

- 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.

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO Y CONDICIONES DE LABORATORIA

Ubicación geográfica del laboratorio de microporpagación de AGROBIOTECH



- Temperatura constante de 20°C,
- Fotoperiodo de 12 horas
- Irradiancia de 16,85 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Nota. Ubicación de laboratorio de microporpagación de AGROBIOTECH, parroquia Tumbaco ubicada a una altitud: de 2320 msnm, latitud: 0°11'10.9" S. y longitud: 78°22'49.0" O . Google Earth (2021).

TRATAMIENTOS

Sales MS al 50 % de concentración

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

Distribución de tratamientos

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



MATERIALES Y MÉTODOS



Pesaje y preparación de medios



Corección de pH



Esterilización Medios y Sutrato 120 psi durante 20 minutos



Unidad experimental



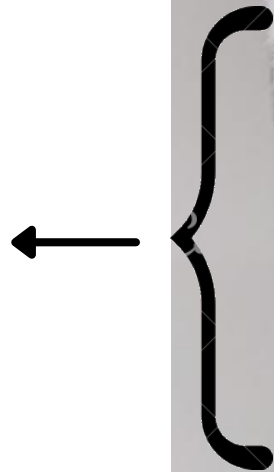
Explante de mora con 30 a 50 mm de altura y 3 hojas



Sustrato hidratado con el tratamiento correspondiente



Tapa del recipiente con 3 orificios



ETIQUETA

- Ax# = niveles de IBA Ax0, Ax1 y Ax2
- Ca# = niveles de Calcio Ca0, CA1,5 y Ca3



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Objetivo 1: 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.



Objetivo 2: 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.



Objetivo 3: Establecer el tratamiento económicamente viable para la aclimatación de plantas de mora sin espinas

Rubus glaucus Benth.



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.

Reactivo	Presentacion Gramos	Precio	Precio (\$/mg)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	500	50,4	0,0001008
IBA	25	27,53	0,001101184

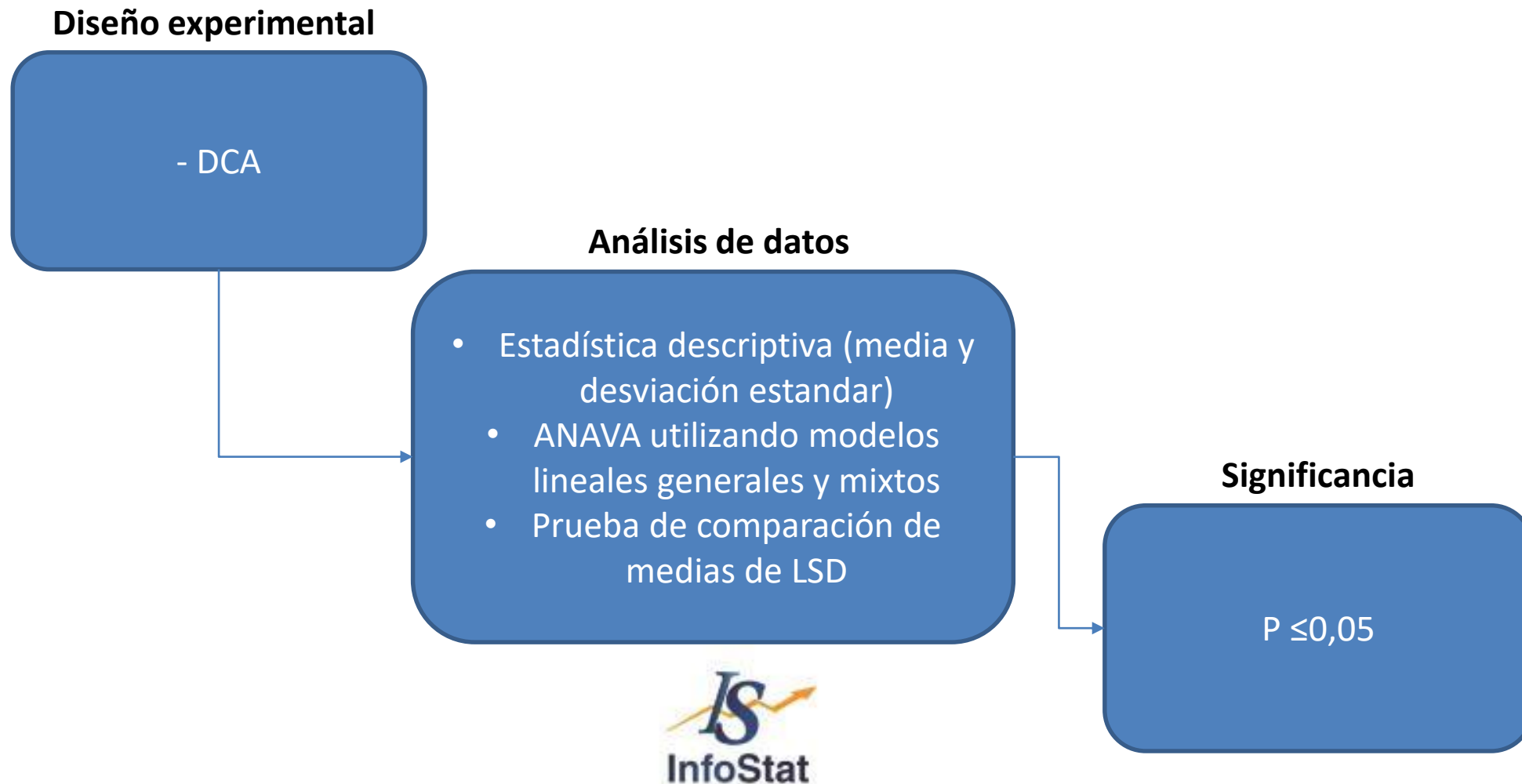
$$\%MBB = \frac{BB - CVT}{BB} \times 100$$

%MBB = Margen de beneficio Bruto

BB = Beneficio Bruto

CVT = Costos variables totales por lotes de tratamiento

Diseño experimental



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- **Objetivo 1:** 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.



- 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 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- 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.



Objetivo 2: 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.

Tabla 3

ANAVA de las variables morfométricas de plántulas in vitro de Rubus glaucus Beth tratadas con diferentes combinaciones de CaCl₂ y AIB

Fuente de Variación	Gl	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
CaCl ₂ x IBA	4	p = 0.0788	p = 0.5058	p = 0.1208	p = 0.2308



Tabla 4 Promedio \pm error estándar de las variables morfométricas 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

- 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 mg L⁻¹ de AIB y una concentración del 25% de sales de MS en el medio.
- 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



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



0 mg L⁻¹ de AIB



1 mg L⁻¹ de AIB



2 mg L⁻¹ de AIB



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	Gl	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

- 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.
- Lau & Yang, (1974) y Kalra & Bhatla, (1998) demostraron que la interacción de auxinas con fuentes de calcio favorece una mayor producción del etileno .

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 CaCl₂.*

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

Objetivo 3: Establecer el tratamiento económicamente viable para la aclimatación de plantas de mora sin espinas *Rubus glaucus* Benth.

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%

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.



GRACIAS



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

