

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**HACIENDA “EL PRADO” IASA**

**ORGANOGENESIS DIRECTA *in vitro* A PARTIR DE EXPLANTES DE**  
**HOJAS DE MORA (*Rubus glaucus* Benth)**

**MARCO ANDRÉS PAUCAR PALAQUIBAY**

**INFORME DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO COMO**  
**REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO**  
**AGROPECUARIO**

**SANGOLQUÍ – ECUADOR**

**2011**

**RESUMEN**

La mora de Castilla pertenece a la familia *Rosaceae* originaria del trópico americano. Es una fruta muy apetecida tanto en el mercado nacional como en el internacional. Cultivada en el país por más de siete décadas, la producción nacional de mora en el Ecuador registra una expansión constante. Su productividad se ha visto afectada por problemas fitosanitarios en el momento de la propagación. La finalidad de esta investigación es desarrollar un protocolo de organogénesis directa a partir de hojas provenientes de plantas *in vitro* de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth), el cual culmine con la aclimatación de las plantas en invernadero.

El presente trabajo consistió en micropropagar brotes de mora a partir de explantes de hojas. Las hojas jóvenes se consiguieron después de 4 semanas de haber podado las plantas. En la fase de regeneración se encontró que las dosis óptimas de 6- bencilaminopurina (BAP) y de ácido indolacético (AIA) fueron  $2.0 \text{ mg.L}^{-1}$  y  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  respectivamente. La mayor regeneración de brotes se registró en los explantes mantenidos en el medio durante 28 días. En la fase de proliferación la dosis de 6- bencilaminopurina (BAP) que generó mayor número de brotes fue  $2 \text{ mg.L}^{-1}$ . En la fase de enraizamiento y aclimatación, el procedimiento citado por Rubio (2010), con la mitad de concentración (MS) y la adición de  $7.38 \text{ uM}$  de ácido indolbutírico (IBA), presentó un 90% de enraizamiento; mientras que la tasa de supervivencia que alcanzó la aclimatación en invernadero fue del 88.88% para este protocolo. Las pruebas histológicas registraron regeneración directa de los brotes obtenidos.

## SUMMARY

The Andean blackberry belongs to the *Rosaceae* family, originating in the American tropics. It is a fruit desired greatly on both the national and international markets. Cultivated in the country for more than seven decades, the national production of blackberries in Ecuador has been in constant expansion. Its productivity, however, can be seen to have been affected by phytosanitary problems during propagation. The objective of this investigation is to develop a protocol for direct organogenesis from leaf explants of *in vitro* Andean blackberry plants (*Rubus glaucus* Benth), and which culminates with the acclimatization in greenhouse.

The present work consists in micropropagating blackberry shoots from leaf explants. The young leaves make it four weeks after having pruned the plants. In the regeneration phase it was found that the optimal doses of 6-benzyladenine (BA) and indoleacetic acid (IAA) were 2.0 mg.L<sup>-1</sup> and 0.5 mg.L<sup>-1</sup> respectively. The most regeneration of shoots was registered in the explants kept in induction for 28 days. In the proliferation phase the dose of 6-benzyladenine (BA) that generated the greatest number of shoots was 2 mg.L<sup>-1</sup>. In the rooting phase and acclimatization, the process cited by Rubio (2010), with medium concentration (MS) and the addition of 7.38 uM of indolebutyric acid (IBA) showed 90% rooting; while the survival rate achieved by those acclimatized in plantpot was 88.88% for this protocol. Histological trials register direct regeneration from the shoots.

**ORGANOGENESIS DIRECTA *in vitro* A PARTIR DE EXPLANTES DE  
HOJAS DE MORA (*Rubus glaucus* Benth)**

**MARCO ANDRÉS PAUCAR PALAQUIBAY**

**REVISADO Y APROBADO**

---

**ING. PATRICIA FALCONÍ**

**DIRECTORA DE CARRERA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

---

**ING. NORMAN SORIA I.**

**DIRECTOR**

---

**ING. FLAVIO PADILLA B.**

**CODIRECTOR**

---

**SECRETARIA ACADÉMICA**

**HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

**ELABORADO POR**

---

**MARCO ANDRÉS PAUCAR PALAQUIBAY**

**DIRECTORA DE LA CARRERA DE INGENIERIA EN  
CIENCIAS AGROPECUARIAS**

---

**ING. PATRICIA FALCONÍ**

**DELEGADO UNIDAD DE ADMISIÓN Y REGISTRO**

---

**DR. CARLOS OROZCO**

**SANGOLQUÍ, 2011**

**ORGANOGENESIS DIRECTA *in vitro* A PARTIR DE EXPLANTES DE  
HOJAS DE MORA (*Rubus glaucus* Benth)**

**MARCO ANDRÉS PAUCAR PALAQUIBAY**

**APROBADO POR LOS SEÑORES MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE  
CALIFICACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS**

	<b>CALIFICACIÓN</b>	<b>FECHA</b>
<b>ING. NORMAN SORIA I. DIRECTOR</b>	_____	_____
<b>ING. FLAVIO PADILLA B. CODIRECTOR</b>	_____	_____

**CERTIFICO QUE ESTAS CALIFICACIONES FUERON PRESENTADAS EN  
ESTA SECRETARIA.**

---

**SECRETARIA ACADÉMICA**

**Declaración de Responsabilidad**

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA (IASA)**

**DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD**

Marco Andrés Paucar Palaquibay

**DECLARO QUE:**

El proyecto de grado denominado “Organogénesis directa *in vitro* a partir de explantes de hojas de mora (*Rubus glaucus* Benth)”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía.

Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 2011

---

Marco Andrés Paucar Palaquibay

**Certificado de Tutoría**

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÈRCITO**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA (IASA)**

**CERTIFICACIÓN**

Ing. Norman Soria I. e Ing. Flavio Padilla B.

**CERTIFICAN**

Que el trabajo titulado “Organogénesis directa *in vitro* a partir de explantes de hojas de mora (*Rubus glaucus* Benth)” realizado por Marco Andrés Paucar Palaquibay, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidos por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a que es un trabajo de interés por la importancia económica de la producción de mora, recomendamos su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a Marco Andrés Paucar Palaquibay que lo entregue a la Ing. Patricia Falconí, en su calidad de Directora de la Carrera.

Sangolquí, 2011

---

**Ing. Norman Soria I.**

**DIRECTOR**

---

**Ing. Flavio Padilla B.**

**CODIRECTOR**

**Autorización de Publicación**

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÈRCITO**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**AUTORIZACIÓN**

Yo, Marco Andrés Paucar Palaquibay

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “Organogénesis directa *in vitro* a partir de explantes de hojas de mora (*Rubus glaucus* Benth)”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 2011

---

Marco Andrés Paucar Palaquibay

**DEDICATORIA**

Dedico todo mi esfuerzo y  
trabajo realizado para la  
ejecución de esta tesis a mi  
Madre, a mi Padre y a mi  
Hermana con mucho cariño.

## **AGRADECIMIENTO**

A la ESPE, su Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias IASA y su personal Docente, por los valiosos conocimientos impartidos.

Al Director, Codirector y Proponente de Proyecto, por sus acertadas recomendaciones para el desarrollo de esta investigación.

A todas las personas que de una u otra manera colaboraron para la planificación, desarrollo y finalización de Proyecto.

**AUTORÍA**

Las ideas expuestas en el presente trabajo de investigación, así como los resultados, discusión y conclusiones son de exclusiva responsabilidad del autor

## ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	Pág.
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 OBJETIVO GENERAL .....	3
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	4
2.1. CULTIVO IN VITRO DE PLANTAS SUPERIORES .....	4
2.1.1. Generalidades.....	4
2.1.2. Biorreguladores.....	5
2.1.3. Tipos de Cultivo <i>in vitro</i> .....	6
2.2. REGENERACIÓN Y MORFOGÉNESIS .....	9
2.2.1. Generalidades.....	9
2.2.2. Tipos de Morfogénesis.....	9
2.3. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	10
2.3.1. Etapas.....	11
2.3.2. Factores que Afecta la Embriogénesis Somática.....	11
2.3.3. Ventajas y Desventajas de la Embriogénesis Somática.....	12
2.4. ORGANOGÉNESIS .....	13
2.4.1. Tipos de Organogénesis.....	13
2.4.2. Vías de Organogénesis.....	14
2.5. CULTIVO DE MORA.....	15
2.5.1. Origen y Generalidades del Cultivo.....	15
2.5.2. Importancia Económica .....	16
2.5.3. Botánica .....	17
2.5.3.1. Clasificación botánica.....	17
2.5.3.2. Descripción morfológica.....	17
2.5.4. Métodos de Propagación.....	18
2.5.4.1. Generalidades.....	18
2.5.4.2. Sistemas de propagación asexual.....	18
2.5.4.3. Problemas productivos y sanitarios .....	19
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
3.1. UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN .....	21
3.1.1. Ubicación Política.....	21
3.1.2. Ubicación Geográfica .....	21
3.1.3. Condiciones de Laboratorio.....	21

3.2.	MATERIALES .....	22
3.2.1.	Materiales y Equipos .....	22
3.2.2.	Reactivos.....	22
3.2.2.1.	Sales minerales .....	22
3.2.2.2.	Sustancias orgánicas .....	22
3.2.2.3.	Biorreguladores.....	23
3.2.2.4.	Otros materiales .....	23
3.3.	MÉTODOS .....	23
3.3.1.	Obtención del Material Vegetal.....	23
3.3.2.	Poda de plantas .....	25
3.3.3.	Fase I: Regeneración.....	26
3.3.3.1.	Medio de inducción .....	26
3.3.3.1.1.	Diseño experimental y análisis estadístico .....	28
3.3.3.1.2.	Variables evaluadas .....	31
3.3.3.2.	Medio de regeneración.....	32
3.3.4.	Pruebas de Histología .....	33
3.3.4.1.	Fijación y deshidratación .....	33
3.3.4.2.	Inclusión en cera de parafina .....	34
3.3.4.3.	Cortes de bloques.....	36
3.3.4.4.	Desparafinización de los cortes .....	36
3.3.5.	Fase II: Proliferación .....	37
3.3.5.1.	Diseño experimental y análisis estadístico .....	37
3.3.5.2.	Variables evaluadas .....	38
3.3.6.	Fase III: Enraizamiento <i>in vitro</i> y Aclimatación .....	39
3.3.6.1.	Enraizamiento <i>in vitro</i> .....	39
3.3.6.2.	Aclimatación de las plántulas .....	40
3.3.7.	Difusión de la Información .....	42
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>43</b>
4.1.	FASE I: REGENERACIÓN.....	45
4.1.1.	Efecto de 6- bencilaminopurina (BAP) y thidiazuron (TDZ) en el medio de inducción del cultivo de mora de Castilla. ....	45
4.1.2.	Efecto de 6- bencilaminopurina (BAP) y thidiazuron (TDZ) en el medio de regeneración del cultivo de mora de Castilla. ....	50
4.2.	PRUEBAS HISTOLÓGICAS.....	55
4.3.	FASE II: PROLIFERACIÓN DE BROTES.....	56
4.4.	FASE III: ENRAIZAMIENTO Y ACLIMATACIÓN.....	60
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>63</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>65</b>
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>70</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>

## LISTADO DE CUADROS

<b>CUADRO</b>	<b>Pág.</b>
Cuadro 3.1. Tratamientos para el medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2011.....	29
Cuadro 3.2. Tratamientos para la fase de proliferación de brotes, IASA I, Ecuador, 2011.....	38
Cuadro 4.1. Análisis de variancia para el número de brotes regenerados en medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2011.....	46
Cuadro 4.2. Promedios del número de brotes regenerados para los biorreguladores en medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2011. ....	47
Cuadro 4.3. Promedios del número de brotes regenerados para los tratamientos en medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2011. ....	48
Cuadro 4.4. Análisis de variancia para el número de brotes en medio de regeneración, IASA I, Ecuador, 2011. ....	51
Cuadro 4.5. Promedios del número de brotes para los biorreguladores en medio de regeneración, IASA I, Ecuador, 2011. ....	52
Cuadro 4.6. Promedios del número de brotes para los tratamientos en medio de regeneración, IASA I, Ecuador, 2011. ....	53
Cuadro 4.7. Análisis de variancia para el número de yemas brotadas, IASA I, Ecuador, 2011. ....	57
Cuadro 4.8. Promedios del número de yemas brotadas para los tratamientos, IASA I, Ecuador, 2011.....	59
Cuadro 8.1. Medios de cultivo <i>in vitro</i> de mora de Castilla, IASA I, Ecuador, 2011.....	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
Cuadro 8.2. Medios de cultivo <i>in vitro</i> de mora de Castilla para organogénesis directa, IASA I, Ecuador, 2011.....	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>

## LISTADO DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>Pág.</b>
Figura 3.1: Establecimiento de plantas de mora de Castilla en el laboratorio, IASA I, Ecuador, 2011.....	24
Figura 3.2: Plantas multiplicadas <i>in vitro</i> , IASA I, Ecuador, 2011. ....	25
Figura 3.3: Poda de plantas <i>in vitro</i> , IASA I, Ecuador, 2011. ....	26
Figura 3.4: Explantes de hojas introducidos abaxialmente en medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2011.....	27
Figura 3.5: Cámara de obscuridad, IASA I, Ecuador, 2011. ....	28
Figura 3.6: Ensayos 1, 2, 3 y 4 en medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2011.....	31
Figura 3.7: Brotes regenerados utilizados para pruebas histológicas, IASA I, Ecuador, 2011. ....	33
Figura 3.8: Fijación de brotes regenerados, IASA I, Ecuador, 2011. ....	34
Figura 3.9: Bloques parafinizados, IASA I, Ecuador, 2011.....	35
Figura 3.10: Yemas brotadas en medio de proliferación, IASA I, Ecuador, 2011. ...	37
Figura 3.11: Plantas en medio de enraizamiento, IASA I, Ecuador, 2011. ....	39
Figura 3.12: Transplante y aclimatación, IASA I, Ecuador, 2011.....	41
Figura 4.1. Brotes regenerados de mora de Castilla en el medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2011.....	43
Figura 4.2. Explantes fenolizados, IASA I, Ecuador, 2011. ....	49
Figura 4.3. Brotes de mora de Castilla en medio de regeneración, IASA I, Ecuador, 2011. ....	51
Figura 4.4. Esquema de brotación a partir los explantes de hojas en mora de Castilla, IASA I, Ecuador, 2011.....	55
Figura 4.5. Corte histológico de un brote regenerado de mora de Castilla, IASA I, Ecuador, 2011. ....	56
Figura 4.6. Yemas brotadas bajo el efecto de diferentes dosis de 6- bencilaminopurina (BAP), IASA I, Ecuador, 2011. ....	57
Figura 4.7. Plantas de mora de Castilla enraizadas <i>in vitro</i> , IASA I, Ecuador, 2011.	60

Figura 4.8. Plantas de mora de Castilla aclimatadas en invernadero, IASA I, Ecuador, 2011. ....	61
Figura 4.9. Protocolo de organogénesis directa <i>in vitro</i> a partir de explantes de hojas en mora de Castilla, IASA I, Ecuador, 2011. ....	62

## LISTADO DE GRÁFICOS

GRÁFICO	Pág.
Gráfico 4.1. Efecto de dos biorreguladores sobre el número de brotes regenerados en medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2011. ....	47
Gráfico 4.2. Efecto de los tratamientos sobre el número de brotes regenerados en medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2011. ....	48
Gráfico 4.3. Efecto de dos biorreguladores sobre el número de explantes de hojas fenolizados en medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2011. ....	50
Gráfico 4.4. Efecto de dos biorreguladores sobre el número de brotes de mora de Castilla en medio de regeneración, IASA I, Ecuador, 2011. ....	52
Gráfico 4.5. Efecto de los tratamientos sobre el número de brotes de mora de Castilla en medio de regeneración, IASA I, Ecuador, 2011. ....	53
Gráfico 4.6. Efecto de dos biorreguladores sobre el número de explantes de hojas fenolizados en medio de regeneración, IASA I, Ecuador, 2011. ....	54
Gráfico 4.7. Relación entre el número de yemas brotadas bajo el efecto de las diferentes dosis de 6- bencilaminopurina (BAP), IASA I, Ecuador, 2011. ....	58
Gráfico 4.8. Efecto de los tratamientos sobre el número de yemas brotadas en mora de Castilla, IASA I, Ecuador, 2011. ....	59

## I. INTRODUCCIÓN

La mora de Castilla o mora azul es la de mayor importancia comercial y la más cultivada en regiones comprendidas entre 1,200 a 3,000 m.s.n.m., económicamente, la mora es una de las frutas más valiosas cultivadas en el mundo entero (Casaca, 2005).

Las importaciones mundiales de mora han aumentado en el tiempo, el crecimiento anual promedio en el periodo 2004-2008 es de 29.6%, debido a que esta fruta se ha vuelto muy cotizada en varios países por cadenas hoteleras, supermercados, mesas familiares, etc. Lo que ha hecho que varios productores del Ecuador se motiven a cultivar y exportar. El crecimiento promedio de la mora ecuatoriana vendida al exterior en el periodo 2004-2008 es de 18.8%, en referencia a las toneladas exportadas este crecimiento en el mismo período es de 82.1% (Ramírez, 2009).

La mora de Castilla registra problemas de productividad en Ecuador, en parte esto se ha visto afectado por el uso de sistemas de propagación tradicionales. Según Monteiro (2004), la mora es propagada por métodos vegetativos, tradicionalmente tiene dos sistemas: estaca y acodo, estos tipos de procesos son los que facilitan la diseminación de plagas y enfermedades que afectan la calidad y cantidad de la producción con la consecuente pérdida económica para el productor. Además con estos métodos el número de plantas homogéneas que se pueden obtener de cada

planta madre es reducido, al propagar se obtiene un número limitado de plantas; mientras que por el método de cultivo de tejidos *in vitro*, se obtendría el doble de plantas y mucho más por el sistema de organogénesis, ya que se obtendrían un gran número de nuevos brotes a partir de cantidades mínimas de tejido (Pati *et al.*, 2004).

Leffering y Kok (1990), fueron los primeros en realizar exitosamente la organogénesis directa en rosas ornamentales (*Rosa hybrida*) a partir de explantes de hojas *in vitro*. Mientras que en la India en el 2004, también pudieron realizar la regeneración directa a partir de explantes foliares en rosa (*Damascena mil*), llegando hasta la fase de invernadero (Pati *et al.*, 2004).

En Mora, existen algunos reportes de micropropagación *in vitro*, Arbeláez (2008) publicó el protocolo de micropropagación de *Rubus glaucus Benth* sin agujones en medio sólido y por inmersión temporal; en la mayoría de los casos se trata de regeneración indirecta (formación previa de callos), donde la variación somaclonal es más frecuente. Sin embargo no existen estudios en organogénesis directa, la misma que es de gran utilidad para propagar plantas élites sin generar variabilidad genética.

Por la necesidad de implementar un método eficaz de propagación en mora de Castilla, en esta investigación realizada en los laboratorios de la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias IASA I, se buscó desarrollar un protocolo en organogénesis directa *in vitro* a partir de explantes foliares; este proceso ofreció altas tasas de multiplicación en un tiempo corto y la obtención de cultivos sanos, libres de

virus y agentes patógenos, así como una rápida reproducción y crecimiento de brotes y raíces en forma sucesiva, uniformidad en el cultivo, disponibilidad del material vegetal a lo largo de todo el año, ayudando de esta manera al desarrollo y competitividad en el sector, y también como base para futuras investigaciones.

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

- Desarrollar un protocolo de organogénesis directa *in vitro* a partir de explantes de hojas de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth), que posibilite: la inducción directa de explantes de hojas, regeneración, proliferación, enraizamiento y aclimatación en invernadero.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Establecer el mejor biorregulador y su dosis óptima entre las citoquininas thidiazuron (TDZ) y 6- bencilaminopurina (BAP) para la organogénesis directa a partir de hojas, en la fase de regeneración.
- Realizar un análisis histológico de los brotes obtenidos a partir de los explantes de hojas para determinar si es organogénesis directa.
- Evaluar los efectos de las distintas dosis de 6- bencilaminopurina (BAP) en la fase de proliferación de brotes.
- Determinar el porcentaje de enraizamiento *in vitro* para este protocolo.
- Determinar la tasa de supervivencia en la fase de aclimatación.
- Difundir la investigación mediante la publicación de este estudio en el repositorio digital ESPE.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. CULTIVO *in vitro* DE PLANTAS SUPERIORES

#### 2.1.1. Generalidades

El cultivo *in vitro* de plantas superiores se define como el cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles, de plantas, semillas, embriones y órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos. La propagación vegetativa *in vitro* (también llamada micropropagación), ha producido resultados de enorme importancia para la agricultura, un considerable ahorro de espacio (invernaderos) y, por consiguiente en energía, ha cambiado profundamente la producción de plantas propagadas vegetativamente (Pierik, 1990).

Ferl, citado por Calva (2005), señala que el cultivo *in vitro* de plantas superiores se basa en el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa.

Muñoz y Reyes (2006), sostienen que el cultivo de tejido *in vitro* permitió introducir el material de mora de Castilla, disminuyendo la posibilidad de introducir insectos, bacterias, hongos o nemátodos, que pueden ser plaga o enfermedad de la mora de Castilla o de otros cultivos de importancia económica. También hace posible

que a partir de unas cuantas plantas se masifique rápidamente material de interés para los agricultores.

### **2.1.2. Biorreguladores**

Las hormonas vegetales son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que coordinan el crecimiento y desarrollo de las plantas. Según Rojas *et al.* (2004), se clasifican en: Auxinas, Citoquinina, Giberelinas, Acido abscísico y Etileno.

**Auxinas:** Hormonas que estimulan el crecimiento de la plantas, especialmente el tallo e inhiben el desarrollo lateral de las ramas. El representante de estas hormonas es el ácido indol acético (AIA), que normalmente se dice que proviene del triptófano, debido a que su estructura tiene gran parecido a éste. Son naturales y otras sintéticas, además del ácido indolacético (AIA) se conocen: ácido naftalacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), 2, 4-D y 2, 4, 5 - T.

**Citoquininas:** Estas hormonas promueven la división y la diferenciación celular. Sus estructuras moleculares poseen núcleo de adenina (anillos nitrogenados). Se encuentran en forma natural y sintética, las más conocidas son: zeatina, kinetina y 6- bencilaminopurina (BAP). El thidiazuron (TDZ) es una versión sintética de citoquinina.

**Giberelinas:** Son hormonas que estimulan el crecimiento de la planta, actuando sinérgicamente con las auxinas. El ácido giberélico es la hormona más conocida de esta clase de compuestos Ácido Giberélico (GA).

**Ácido Abscísico:** Esta hormona tiene función antagónica a otras hormonas, como por ejemplo, es inhibidora del crecimiento de la plántula y de la germinación de las semillas. Estimula la senescencia de las hojas.

**Etileno:** Es una hormona que estimula el crecimiento trasverso en las células de la planta; estimula la maduración de los frutos, el envejecimiento de las flores e inhibe el crecimiento de las semillas (Saavedra, 2008).

La presencia de las citoquininas actúan en interacción con las auxinas en el papel que ellas ejercen sobre la desdiferenciación y sobre la división celular, es importante realizar un justo equilibrio auxinas/citoquininas. Los efectos de la auxina son evidentes sobre la rizogénesis, por lo que es probable que las citoquininas en interacción con otras sustancias causen el mismo efecto (Rojas *et al.*, 2004).

### **2.1.3. Tipos de Cultivo *in vitro***

Existen muchos tipos diferentes de cultivo *in vitro*, de la misma forma que se encuentran materiales diferentes en la constitución de las plantas. Pierik (1990) sostiene que estos tipos de cultivos son:

**Cultivo de Plantas Intactas:** Se siembra la semilla *in vitro*, obteniéndose primero una plántula y finalmente una planta.

**Cultivo de Embriones:** Se cultiva el embrión aislado después de retirar el resto de los tejidos de la semilla.

**Cultivo de un órgano aislado:** Se pueden distinguir distintos tipos, por ejemplo: cultivo de meristemas, cultivo de ápices del vástago, cultivo de raíces, cultivo de anteras, etc. Generalmente una porción (de tejido, o un órgano), aislada de una planta, se denomina explante, y a su cultivo, cultivo de explante.

**Cultivo de Callo:** Se llama así, cuando una porción de tejido se desdiferencia *in vitro*, originando un callo.

**Cultivo de Células Aisladas:** Es el crecimiento de células individuales, obtenidas de un tejido, callo o cultivo en suspensión, con la ayuda de enzimas o mecánicamente.

**Cultivo de Protoplastos:** Se obtiene a partir de células por digestión enzimática de la pared celular.

Por otro lado, de Fossart, citado por Pierik (1990), distinguía tres tipos de cultivos *in vitro* en plantas superiores:

**Organizado:** Se refiere al cultivo de plantas completas o casi completas, o al cultivo de órganos, donde se mantiene la estructura característica del órgano o de la planta. Se parece mucho a la propagación vegetativa *in vivo*, por esqueje, división, estolones y yemas o vástagos axilares. Si la estructura orgánica no se destruye, la descendencia obtenida es idéntica al material vegetal original.

**No organizado:** Si las células y los tejidos se aíslan de una porción organizada de una planta, se desdiferencian y cultivan, se obtiene un crecimiento no organizado (en forma de callo). Si el callo se disgrega, se originan grupos de células (agregados), y/o células aisladas (cultivo en suspensión). El crecimiento no organizado se induce totalmente por el uso de (muy) altas concentraciones de auxina y/o citoquinina en el medio nutritivo. La estabilidad genética de los cultivos no organizados es frecuentemente alta.

**No organizado/ Organizado:** Se trata de un intermedio entre los dos anteriores. Las células de un órgano o tejido aislado primero se desdiferencian, para posteriormente formar tejidos o una capa de tejido calloso. A partir de estos se desarrollan rápidamente órganos (raíces y/o vástagos), o incluso individuos completos (pro-embriones o embriones). Se debe tener en cuenta que las estructuras

organizadas se pueden desarrollar a partir de cultivos no organizados espontáneamente o por medio de técnicas especiales. En todos estos casos la descendencia no es completamente idéntica con relación al material original.

## **2.2. REGENERACIÓN Y MORFOGÉNESIS**

### **2.2.1. Generalidades**

Endress, citado por Ruiz (1999), indica que la regeneración se refiere a la reconstrucción del tejido a partir de una o varias células. La morfogénesis se define como el origen y los cambios en la forma específica (estructura y organización) durante el desarrollo de un organismo, esto puede ocurrir en la organogénesis o en la embriogénesis somática y dependen tanto de la naturaleza del explante como del genotipo.

### **2.2.2. Tipos de Morfogénesis**

La embriogénesis somática y la organogénesis son dos procesos morfogénicos muy frecuentes en el cultivo *in vitro* de especies vegetales. La embriogénesis somática es el proceso por el cual se obtiene una estructura similar al embrión zigótico sin que medie la fertilización de los gametos. En la organogénesis pueden obtenerse tallos, raíces o flores. Estos órganos son inducidos a partir de una célula o de un grupo de células que, según las condiciones de cultivo, tienen la propiedad de mantenerse en activa división (Huaranca, 2008).

### 2.3. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Cuando los embriones se regeneran a partir de las células o tejidos somáticos (haploides, diploides, etc.), se habla de una embriogénesis somática, ésta se considera opuesta a la embriogénesis zigótica (Ruiz, 1999). Existen dos tipos:

**La Embriogénesis directa:** Parrott, citado por Pérez (2009) indica que la vía directa, involucra la formación de los embriones somáticos en una parte del tejido del explante sin la formación de callos, ya que las células dentro de un embrión cigótico son de por sí embriogénicas, es posible inducir las para que estas se dividan para formar un embrión somático. En este caso, las células pre-existentes se dividen directamente para formar un embrión somático.

**La Embriogénesis indirecta:** Tisserat, citado por Pérez (2009) indica que la vía indirecta, que requiere una fase intermedia de callo formado por un conjunto de diferentes tipos de células no organizadas y que conservan la capacidad de dividirse. Una vez organizado el callo este prolifera, se inicia la formación de pro-embryones, usualmente en este medio de cultivo con altas concentraciones de auxinas y luego se transfieren los callos a un medio de cultivo con menores concentraciones de reguladores del crecimiento para inducir la formación de los embriones somáticos a partir de los pro-embryones iniciales.

### 2.3.1. Etapas

La regeneración es un proceso que comprende diferentes fases que se suceden de manera similar para los tipos de morfogénesis citadas. De Klerk *et al.*, citado por Huaranca (2008), indica que se denominaron a estas 3 diferentes fases como:

**Fase de adquisición de la competencia:** En esta fase las células no responden al estímulo organogénico pero adquieren esa competencia durante una fase de desdiferenciación.

**Fase de inducción:** En esta fase las células son receptivas al estímulo morfogénico y hay una relación directa entre el tipo, concentración y combinación de reguladores del crecimiento agregados al medio de cultivo y el órgano a desarrollar.

**Fase de realización:** En esta fase, la célula sufre las sucesivas divisiones para formar el órgano determinado.

### 2.3.2. Factores que Afecta la Embriogénesis Somática

**Medio de cultivo:** Según su concentración semisólida de macronutrientes estimula o no la inducción y desarrollo del embrioides en las fases de iniciación y mantención (Pierik, 1988).

**Especie y origen del explante:** Determinante es la fuente del explante y su estado de desarrollo en el éxito de cualquier etapa de la embriogénesis.

**Elemento gelificante:** Se encuentran efectos variados en los distintos cultivos.

**Fitorreguladores:** Se encuentra experimentado que en herbáceas y se afirma que una dosis alta de auxina se requiere en la etapa de inducción embriogénica del callo para después su maduración en un medio privado de la misma (Pierik, 1988).

**Estado de desarrollo del explante:** La principal fuente de explante utilizada corresponde a embriones inmaduros en un estado inicial de desarrollo con la mayor parte de sus estructuras tisulares aun en formación. Un problema frecuente es la vía de introducción de material es identificar el período exacto post-fecundación en que el embrión se encuentra en un estado menos desarrollado. Esto se complica cuando los períodos de fecundación transcurren meses o años después de la polinización, por lo tanto se requiere especial cuidado en el análisis del ciclo de fecundación de la especie en cuestión (Hermosilla, 2011).

### **2.3.3. Ventajas y Desventajas de la Embriogénesis Somática**

**Ventajas:** Naturaleza bipolar del embrión, facilidad para su automatización, aumento de coeficientes de multiplicación, se comporta con los principios de la cinética microbiana y permite el encapsulamiento de estas estructuras.

**Desventajas:** Desconocimiento sobre parámetro que regula el proceso y número limitado de especies que portan un sistema eficiente de embriogénesis somáticas (Mosquera, 2007).

## 2.4. ORGANOGÉNESIS

La organogénesis consiste en la formación de nuevos órganos (raíces y/o brotes adventicios) en los explantes cultivados *in vitro* (Ruiz, 1999). Es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de este en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía formación de primordios de raíces y el subsecuente enraizamiento final.

En contraste con la embriogénesis somática, en la vía organogénica para la formación de una planta completa, ya sea por la vía directa o indirecta, se requiere de una secuencia de medios de cultivo, ya que aquellos medios que favorecen el desarrollo de los brotes inhiben la formación de raíces y viceversa (Pérez, 1988).

### 2.4.1. Tipos de Organogénesis

**Organogénesis directa:** es la formación de órganos directamente sobre la superficie de explantes cultivados intactos. El proceso no implica la formación de callo. Opuesto de organogénesis indirecta.

**Organogénesis indirecta:** es la formación de órganos en tejidos de callo derivados de explantes. Opuesto de organogénesis directa (Ruiz, 1999).

#### **2.4.2. Vías de Organogénesis**

La organogénesis ha sido la base fundamental de la multiplicación vegetativa y dentro de ella pueden diferenciarse dos vías: la formación de yemas axilares y la formación de yemas adventicias (Pérez, 1988).

**Formación de yemas axilares:** Esta técnica se basa en la formación de brotes a partir de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas y primordios de las hojas, los cuales son divididos o subcultivados respectivamente. Este método a pesar de no ser el más rápido, ha sido el más utilizado para la propagación comercial debido en primer lugar a la facilidad con que se ha establecido en la mayoría de las especies y en segundo lugar a la estabilidad genética de las plantas regeneradas, siendo el sistema de regeneración en el cual se reportan los menores índices de variación genética.

La principal desventaja radica en la laboriosidad del proceso, lo cual implica altos costos por mano de obra, bajos coeficientes de multiplicación en comparación con otros sistemas de regeneración y escasa posibilidad de automatización del proceso productivo. No obstante existen posibilidades de automatizar algunas etapas del proceso con la utilización de birreactores y sistemas de inmersión temporal.

**Formación de yemas adventicias:** Es la formación de novo de yemas a partir de meristemas preexistentes o tejido no meristemático, las cuales se originan de un pequeño grupo de células, cuando se cultivan los explantes en medios de concentraciones elevadas de citoquininas.

Con esta técnica es posible producir un mayor número de plantas por unidad de tiempo en comparación con el método de yemas axilares y a la vez presenta mayores posibilidades de mecanización automatización, existiendo ya varios ejemplos de utilización de birreactores para su producción. Sin embargo, al igual que el método de yemas axilares tiene la limitante de que el proceso productivo es realizado en dos etapas: producción de brotes y crecimiento-enraizamiento. Adicionalmente presenta el inconveniente de que puede ser una fuente de variación genética debido al propio origen unicelular de las yemas adventicias. Este método ha tenido su mayor aplicación en la propagación de plantas ornamentales donde la ocurrencia de plantas fuera de tipo no es un problema (Pérez, 1988).

## **2.5. CULTIVO DE MORA**

### **2.5.1. Origen y Generalidades del Cultivo**

Centro Agrícola de Quito (1992), señala que la mora es una planta de origen silvestre, nativa de climas fríos y moderadamente fríos de los andes ecuatorianos. Vive sola o en grupos, en las quebradas, montes, chaparros, al borde de caminos y carreteras.

Esta planta es cultivada comercialmente en varios países de América, Ecuador, Colombia, Chile, Panamá, Guatemala y México. La mora *Rubus* sp. y especialmente la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) fue encontrada por el investigador Popenoe, creciendo en estado silvestre en los andes ecuatorianos individualmente o formando grupos, con otras variedades. En el año 1921 este investigador ya encontró pequeñas plantaciones de mora de Castilla en las provincias de Tungurahua, Imbabura y Pichincha. La mora es una fruta muy apetecida tanto en el mercado nacional como internacional, por ser rica en minerales y vitaminas tiene gran futuro como producto de exportación, fresca o congelada (Centro Agrícola de Quito, 1992).

### **2.5.2. Importancia Económica**

**El mercado nacional:** La producción nacional de mora registra una expansión constante, lo que hace suponer que sus perspectivas son promisorias y que puede convertirse en una excelente alternativa para diversificar las exportaciones. En Ecuador, las dos variedades más importantes de mora son la de Castilla y la de brazos, aunque la primera es la más cultivada (Herrera y Bravo, 2010).

**Localización:** La mora se la cultiva en los valles del callejón interandino y en las estribaciones de la sierra, siendo las principales provincias productoras del país Tungurahua 2152 Tm/año, Cotopaxi 1200 Tm/año y Bolívar 1812 Tm/año (Proyecto SICA, 2006).

**Superficie Plantada y Rendimiento:** INIAP (2008) señala que la superficie cultivada alcanza las 5247 hectáreas y en su mayor parte está en manos de pequeños y medianos productores con promedios que van desde las 200 hasta las 2000 plantas en producción. En el 2002 según el III Censo Nacional Agropecuario, el Ecuador contó con una producción de 10490 Tm.

### **2.5.3. Botánica**

#### **2.5.3.1. Clasificación botánica**

Distintos autores clasifican a la mora de la siguiente manera: Reino: Vegetal, División: Antofita, Clase: Dicotiledónea, Subclase: Arquiclamídea, Orden: Rosales, Familia: Rosácea, Género: *Rubus*, Especie: *glaucus*, *floribundus*, *gigantus*, etc., Nombre científico: *Rubus* sp., Nombre vulgar: mora.

Seelig, citado por Bejarano (1992), indica que se considera que existen más de 250 especies relativamente importantes según su aceptación comercial en los diferentes países, y un gran número de variedades.

#### **2.5.3.2. Descripción morfológica**

La mora de Castilla es un arbusto que alcanza varios metros de altura, en el cual el tronco se divide en varias ramas de color cenizo, alargadas, poco ramificadas y con un número considerable de espinas, las hojas son compuestas, de tres a cinco hojuelas, tienen peciolo largo y son pubescentes; el fruto es múltiple o colectivo,

constituido por pequeñas insertadas sobre un corazón blanco y blando, de forma cónica que al madurar adquiere un color rojo oscuro que se torna morado; las flores son de colora blanco y blanco rosado (Reina, 1998).

#### **2.5.4. Métodos de Propagación**

##### **2.5.4.1. Generalidades**

Para establecer cultivos comerciales de mora de Castilla se recomienda la propagación asexual, los métodos que más se destacan son los acodos de punta, acodos rastreros y por estaca. La propagación sexual no se utiliza principalmente debido a que su germinación y desarrollo es lento, además posee poca semilla viable es decir autoincompatibilidad o polen no viable (Mendoza, 2009).

##### **2.5.4.2. Sistemas de propagación asexual**

**El Acodo:** El mejor método para obtener plantas vigorosas consiste en el enraizamiento de una zona del tallo mientras la rama continúa adherida a la planta madre. Acodo rastrero se realiza en matas de tallos largos, para lo cual se escogen ramas de buenas características, se tiende en el suelo sin arrancar de la planta madre, se tapa con tierra cada 25 cm hasta cubrir toda la rama. De una rama se pueden obtener de tres a cuatro acodos e igual número de plantas. De la sección de la rama tapada con tierra nacen raíces, y a los tres meses están listas las nuevas plantas. El acodo de punta se realiza arqueando una rama y enterrando la punta 10 cm en el suelo o en fundas con tierra. De la punta enterrada nacen las raíces y al cabo de un

mes se corta a 50 cm del suelo a la rama, obteniéndose una planta lista para el transplante en el lugar definitivo.

**Estacas:** La propagación por estacas consiste en cortar trozos de 35 cm de tallos vigorosos y de buenas características. El diámetro de los tallos debe ser de 1 cm y cada estaca debe tener tres a cuatro yemas. La siembra de las estacas tratadas se realiza directamente en fundas con tierra preparada o en platabandas (Monteiro, 2004).

#### **2.5.4.3. Problemas productivos y sanitarios**

La mora es una fruta de consumo diario en las familias ecuatorianas por lo que su demanda alcanza los 2 kilogramos por familia; su producción en las provincias de Bolívar, Cotopaxi y Tungurahua no alcanza a la óptima de 5 kilogramos por planta y por ciclo, debido a problemas sanitarios debido al uso de los sistemas tradicionales de propagación donde las enfermedades se diseminan fácilmente (INIAP, 2008).

Actualmente la propagación se realiza por la vía asexual (acodo y estaca); pero éste presenta dificultades en la etapa de enraizamiento y brotes de las primeras hojas y ramas, ya que esta agota sus reservas y pierde vigor para continuar su desarrollo. Por otro lado, la movilización de estacas o plantas representa un medio apropiado para la diseminación de insectos y micro-organismos perjudiciales para la agricultura. En busca de ofrecer plantas de mora en cantidad suficiente y de buena calidad genética y fitosanitaria es conveniente realizar una propagación *in vitro* en

determinados momentos y eslabones del ciclo productivo del cultivo de mora. Las técnicas del cultivo *in vitro* es un instrumento de gran importancia para propagar masivamente plantas de alta calidad, en condiciones controladas y pequeño espacio a diferencia del método convencional (Cisne *et al.*, 2005).

Algunas entidades del país ya están realizando propagación *in vitro* a través de meristemos, lo que garantiza la obtención de plantas libres de algunas enfermedades vasculares. Ya existen cultivos establecidos con estas plantas y los resultados en rendimiento y calidad de fruta son promisorios.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN**

El presente estudio se lo realizó en las instalaciones de la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuaria IASA, Hacienda “El Prado” de la Escuela Politécnica del Ejército.

##### **3.1.1. Ubicación Política**

La investigación se llevó a cabo en la Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Parroquia de Sangolquí, Sector “San Fernando” en la Hacienda “El Prado”.

##### **3.1.2. Ubicación Geográfica**

La Hacienda “El Prado” se encuentra localizada en las coordenadas:

0°23'4,46''S; 78°24'52,90''O UTM.

##### **3.1.3. Condiciones de Laboratorio**

El cuarto de crecimiento que alojó las plantas *in vitro*, tiene las siguientes condiciones: temperatura promedio de 22.5°C, humedad relativa del 63% e intensidad lumínica de 2300 lux durante dieciséis horas diarias.

## 3.2. MATERIALES

### 3.2.1. Materiales y Equipos

El equipo y los materiales de laboratorio utilizados fueron: autoclave, estufa, cámara de flujo laminar, estereoscopio, microscopio electrónico, micrótomo, porta objetos, estilete, destilador, microondas, pH-metro, balanza analítica, agitador magnético, cámara fotográfica, recipientes plásticos de 50 y 250 mL, cajas *petri* plásticas, parafilm, tubos de ensayo, micropipetas, vasos de precipitación, Erlenmeyers, tijeras, bisturí, pinzas, papel toalla, papel aluminio, bandeja con alveolos, fundas de vivero, turba, fibra de coco, humus.

### 3.2.2. Reactivos

#### 3.2.2.1. Sales minerales

Las sales minerales fueron: nitrato de amonio, nitrato de potasio, fosfato ácido de amonio, nitrato de calcio, sulfato de potasio, nitrato de calcio, sulfato de potasio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, sulfato de zinc, sulfato de cobre, cloruro de calcio, cloruro de cobalto, yoduro de potasio, fosfato ácido de potasio, ácido bórico, Fe EDTA, molibdato de sodio, sulfato ferroso, nitrato de plata.

#### 3.2.2.2. Sustancias orgánicas

Dentro de las sustancias orgánicas se utilizaron: tiamina, piridoxina, ácido nicotínico, glicina, polivinil pirrolidona (PVP), ácido cítrico, ácido ascórbico, myo-inositol, sucrosa, agar.

### **3.2.2.3. Biorreguladores**

Los biorreguladores fueron: ácido indolacético (AIA), 6- bencilaminopurina (BAP), thidiazuron (TDZ), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (IBA).

### **3.2.2.4. Otros materiales**

Dentro de otros materiales se utilizaron: formaldehído, ácido acético glacial, alcohol 70% y 96% y 100%, xileno, cera de parafina, glicerol, orseína.

## **3.3. MÉTODOS**

La investigación se desarrolló en tres fases: fase de regeneración, fase de proliferación, fase de enraizamiento y aclimatación.

### **3.3.1. Obtención del Material Vegetal**

El material vegetal se obtuvo de hojas provenientes de plantas de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) mantenidas en cultivo *in vitro* en el Área de Tejidos Vegetales de la Carrera de Ciencias Agropecuarias IASA.

**FOTO**

**Fuente:** Paucar M, 2011.

**Figura 3.1: Establecimiento de plantas de mora de Castilla en el laboratorio, IASA I, Ecuador, 2011.**

Para el establecimiento de las plantas en el laboratorio, se utilizaron fragmentos de tallo con un nudo, se colocaron en recipientes plásticos de 50 mL dos miniestacas por recipiente (Figura 3.1.), con un medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  myo-inositol,  $75 \text{ mg.L}^{-1}$  PVP,  $25 \text{ mg.L}^{-1}$  ácido ascórbico,  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  6- bencilaminopurina (BAP),  $0.2 \text{ mg.L}^{-1}$  ácido indolacético (AIA), 0.75% sucrosa y 0.7% Agar. El pH del medio fue ajustado a 5.8 antes de ser autoclavado.

Cada dos semanas, las plantas de mora de Castilla cultivadas *in vitro*, fueron multiplicadas para obtener el número de plantas necesarias que proveyeron la cantidad de hojas requeridas para realizar los ensayos. Este proceso se llevo a cabo en recipientes plásticos con capacidad de 250 mL (Figura 3.2.).

**FOTO**

**Fuente:** Paucar M, 2011.

**Figura 3.2: Plantas multiplicadas *in vitro*, IASA I, Ecuador, 2011.**

Para la multiplicación el medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) fue suplementado con  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  myo-inositol,  $150 \text{ mg.L}^{-1}$  PVP,  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  ácido ascórbico,  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  6- bencilaminopurina (BAP),  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  ácido indolacético (AIA), 3% sucrosa y 0.7% Agar. El pH del medio fue ajustado a 5.8 antes de ser autoclavado.

### **3.3.2. Poda de plantas**

Para la poda de las plantas se utilizó el procedimiento sugerido por Pati *et al.* (2004), utilizando hojas juveniles de plantas mantenidas *in vitro*. Para la obtención de dichas hojas se podaron las plantas (Figura 3.3.) y transcurridas cuatro semanas se procedió a la extracción de las mismas.

**FOTO**

**Fuente:** Paucar M, 2011.

**Figura 3.3:** Poda de plantas *in vitro*, IASA I, Ecuador, 2011.

### **3.3.3. Fase I: Regeneración**

#### **3.3.3.1. Medio de inducción**

Al finalizar las cuatro semanas, de acuerdo a lo descrito por Pati *et al.*, (2004), se seccionaron las hojas en la base y se las introdujeron abaxialmente con el peciolo en cajas *petri* en medio de inducción (Figura 3.4.) y constituido por la mitad de concentración de sales MS (Murashige y Skoog, 1962).

**FOTO**

**Fuente:** Paucar M, 2011.

**Figura 3.4: Explantes de hojas introducidos abaxialmente en medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2011.**

Además se aplicaron diferentes dosis de thidiazuron (TDZ) y diferentes dosis de 6- bencilaminopurina (BAP) (Cuadro 3.1.). Antes de añadir el agar (0.7%), el pH se ajustó a 5.8. Luego de introducidas las hojas en las cajas, se las mantuvo por 3 días en oscuridad (Dubois y de Vries, citado por Pati *et al.*, 2004) (Figura 3.5.).

Las condiciones de oscuridad impiden la fenolización de los explantes. La fenolización es la liberación de compuestos fenólicos, la oxidación fenólica aparece como consecuencia de los cortes durante la preparación de los explantes. Los compuestos oxidados son altamente fitotóxicos, lo cual puede llegar a producir la muerte de los explantes (Marulanda, 2001).

**FOTO**

**Fuente:** Paucar M, 2011.

**Figura 3.5: Cámara de oscuridad, IASA I, Ecuador, 2011.**

### **3.3.3.1.1. Diseño experimental y análisis estadístico**

Se estableció un diseño completamente al azar (DCA) en análisis grupal, con siete tratamientos y tres repeticiones, cada unidad experimental estuvo constituida por una caja *petri* donde se colocó 4 explantes de hoja y se dispensaron 20 mL de medio. Los factores a probar en el medio de inducción fueron los biorreguladores de crecimiento: B1= thidiazuron (TDZ) y B2= 6- bencilaminopurina (BAP). A tres dosis, D1= alta, D2= media y D3= alta. Los tratamientos a comparar son el resultado de la combinación de biorreguladores + dosis (Cuadro 3.1.).

**Cuadro 3.1. Tratamientos para el medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2011.**

TRATAMIENTOS	NOMENCLATURA	DESCRIPCIÓN mg.L <sup>-1</sup>
<b>T1</b>	B1D1	1.5 TDZ
<b>T2</b>	B1D2	1.0 TDZ
<b>T3</b>	B1D3	0.5 TDZ
<b>T4</b>	B2D1	2.0 BAP
<b>T5</b>	B2D2	1.5 BAP
<b>T6</b>	B2D3	1.0 BAP
<b>T7</b>	Testigo	0

**Fuente:** Paucar M, 2011.

Las diferentes dosis de B1= thidiazuron (TDZ) fueron aplicadas con el mismo nivel de ácido naftalenacético (ANA) (0.2 mg.L<sup>-1</sup>) y las dosis de B2= 6- bencilaminopurina (BAP) fueron aplicadas con el mismo nivel de ácido indolacético (AIA) (0.5 mg.L<sup>-1</sup>). El testigo absoluto, fue preparado con la mitad de concentración MS y sin la adición de biorreguladores ni sucrosa.

Aplicados los tratamientos y recopilados los datos, se realizó un análisis de varianza, posteriormente se hizo una prueba de Duncan al 5% para tratamientos, entre grupos y dentro de cada grupo para determinar cuáles de los tratamientos y grupos reflejaron diferencias estadísticas significativas.

Para determinar el tiempo más adecuado de la exposición de los explantes en medio de inducción se realizaron cuatro ensayos:

**a) Ensayo 1 (E1).**- Los explantes fueron colocados en el medio de inducción bajo 2300 lux y se transfirieron al medio de regeneración a los 14 días. A los 14 días se evaluará el número de brotes que se formaron.

**b) Ensayo 2 (E2).**- Los explantes fueron colocados en el medio de inducción bajo 2300 lux y se transfirieron al medio de regeneración a los 21 días. A los 14 y 21 días se evaluará el número de brotes que se formaron.

**c) Ensayo 3 (E3).**- Los explantes fueron colocados en el medio de inducción bajo 2300 lux y se transfirieron al medio de regeneración a los 28 días. A los 14, 21 y 28 días se evaluará el número de brotes que se formaron.

**d) Ensayo 4 (E4).**- Los explantes fueron colocados en el medio de inducción suplementado con 30% de sucrosa bajo 2300 lux y se transfirieron al medio de regeneración a los 28 días. A los 14, 21 y 28 días se evaluará el número de brotes que se formaron.

Para medir el efecto real de thidiazuron (TDZ) y 6- bencilaminopurina (BAP) en la formación de brotes, se realizaron tres ensayos sin sucrosa.

**FOTOS**

**Fuente:** Paucar M, 2011.

**Figura 3.6: Ensayos 1, 2, 3 y 4 en medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2011.**

**3.3.3.1.2. Variables evaluadas**

**Número de brotes regenerados:** Se contaron los brotes con la ayuda del estereoscopio en el tiempo indicado anteriormente en cada ensayo.

**Días a la formación de brotes:** Se evaluó visualmente el número de días que transcurrieron desde la introducción de las hojas al medio de inducción hasta la formación del primer vestigio de un brote.

**Fenolización:** Se evaluó visualmente el número de explantes que presentaron pardeamiento en sus tejidos.

### **3.3.3.2. Medio de regeneración**

Transcurridos los tiempos de cada ensayo, se transfirieron los explantes a cajas *petri* con medio de regeneración, el cual consistió en medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 0.75% agar, 0.5 mg.L<sup>-1</sup> 6- bencilaminopurina (BAP) y 0.2 mg.L<sup>-1</sup> ácido indolacético (AIA). Los tres primeros días las cajas se colocaron en oscuridad (Dubois y de Vries, citado por Pati *et al.*, 2004).

En el medio de regeneración a los 21 días de transferidos los explantes del medio de inducción, se evaluaron las siguientes variables:

**Número de brotes regenerados:** Se contaron los brotes con la ayuda del estereoscopio al final de la fase.

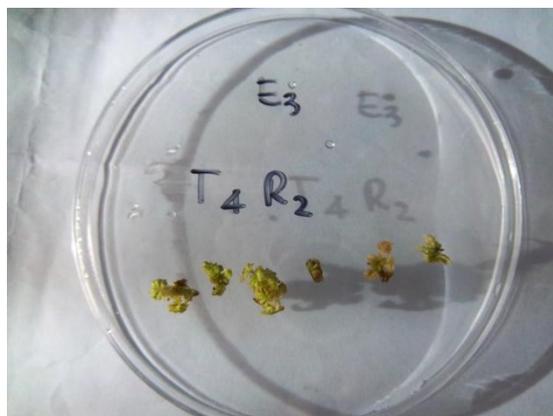
**Días a la formación de brotes:** Se evaluó visualmente el número de días que transcurrieron desde la introducción de las hojas al medio de regeneración hasta la formación del primer vestigio de un brote.

**Fenolización:** Se evaluó visualmente el número de explantes que presentaron pardeamiento en sus tejidos.

### **3.3.4. Pruebas de Histología**

Para esta fase se utilizaron los brotes que se obtuvieron en la fase de regeneración, en las diferentes fases de desarrollo (Figura 3.7).

#### **FOTO**



**Fuente:** Paucar M, 2011.

**Figura 3.7: Brotes regenerados utilizados para pruebas histológicas, IASA I, Ecuador, 2011.**

#### **3.3.4.1. Fijación y deshidratación**

Los brotes fueron fijados (Figura 3.8.) en una solución que contuvo: 70% de etanol, 40% formol y ácido glacial acético en una proporción 17:2:1 (volumen), según las recomendaciones de De Neergard (1997). Después se los introdujo en las siguientes soluciones:

- a) 70% etanol por 1-2 horas.
- b) 70% etanol durante toda la noche.
- c) 96% etanol por 2-4 horas.

d) 96% etanol por 2-4 horas.

e) 100% etanol por 2-4 horas.

### FOTO



**Fuente:** Paucar M, 2011.

**Figura 3.8: Fijación de brotes regenerados, IASA I, Ecuador, 2011.**

#### **3.3.4.2. Inclusión en cera de parafina**

La inclusión en cera de parafina se la realizó según la metodología de De Neergard (1997). De acuerdo al procedimiento los brotes fueron introducidos en las siguientes soluciones:

a) 100 % etanol por toda la noche.

b) 100 % etanol+ xileno 3:1 por 2 horas.

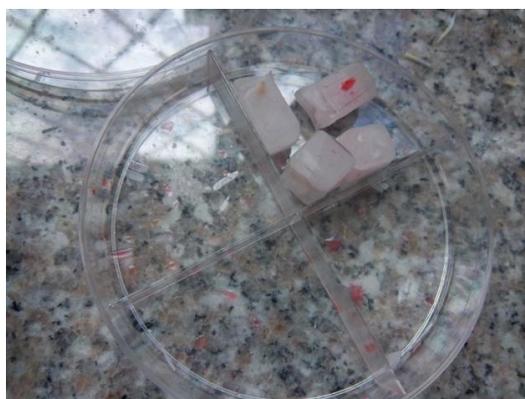
c) 100 % etanol+ xileno 1:1 por 2 horas.

d) 100 % etanol+ xileno 1:3 por 2 horas.

e) 100 % xileno por 2 horas.

- f) 100 % xileno por toda la noche.
- g) Xileno + cera de parafina a 60°C por 24 horas (en una estufa con ventilación).
- h) La cera de parafina líquida fue añadida durante los siguientes tres días hasta que el xileno se evaporó.
- i) Se realizaron moldes de cartulina de 1.5 cm<sup>3</sup> y se los embebió con glicerol.
- j) Se colocó cera de parafina en la estufa 24 horas antes de utilizarla.
- k) La cera de parafina líquida se colocó en los moldes embebidos con glicerol hasta la mitad, sin dejar que la cera se condense.
- l) Se colocaron los brotes en los moldes y se los cubrió con parafina.
- m) Para conseguir una condensación rápida de la parafina, después de colocar un brote en un bloque y cubrirlo con la parafina, se lo introdujo en agua fría para impedir su cristalización (Figura 3.9.).

### FOTO



**Fuente:** Paucar M, 2011.

**Figura 3.9: Bloques parafinizados, IASA I, Ecuador, 2011.**

### **3.3.4.3. Cortes de bloques**

- a) Se realizaron cortes longitudinales con ayuda del micrótopo (10  $\mu\text{m}$  de grosor).
- b) Cada cinta de parafina obtenida se colocó en agua fría para que se estire, se la recogió con una placa de vidrio.
- c) Las placas de vidrio con las cintas de parafina se calentaron en agua caliente para que las muestras se adhieran al vidrio.

### **3.3.4.4. Desparafinización de los cortes**

Según De Neergard (1997), para la remoción de la cera de parafina se introdujo las placas de vidrio con los cortes en las siguientes mezclas:

- a) Xileno por 1 min.
- b) Xileno+ etanol 1:1 por 1 min.
- c) 100% etanol por 1 min.
- d) 100% etanol por 1 min.
- e) 96% etanol por 1 min.
- f) 70% etanol por 1 min.
- g) 50% etanol por 1 min.
- h) 30% etanol por 1 min.
- i) Agua destilada por 1 min.
- j) Finalmente se tiñeron las muestras con orseína para verlas al microscopio.

### **3.3.5. Fase II: Proliferación**

Para la proliferación de yemas brotadas, se procedió a colocar los brotes en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 3% de sucrosa, 7g de agar y se colocó tres dosis de 6- bencilaminopurina (BAP) (Figura 3.10.), en concentraciones baja, media, y alta (Cuadro 3.2.). Cada cuatro semanas fueron transferidos a subcultivos con medio de multiplicación.

#### **FOTO**



**Fuente:** Paucar M, 2011.

**Figura 3.10: Yemas brotadas en medio de proliferación, IASA I, Ecuador, 2011.**

#### **3.3.5.1. Diseño experimental y análisis estadístico**

Se estableció un diseño completamente al azar (DCA), con cuatro tratamientos y cinco repeticiones, cada unidad experimental contó con un brote proveniente de la fase de regeneración y estuvo constituida por un tubo de ensayo de vidrio, donde se dispensó 10 mL de medio. El factor a probar en la fase de proliferación de brotes *in vitro* fue el biorregulador de crecimiento 6- bencilaminopurina (BAP) con dosis alta, media y baja. Los tratamientos a comparar se detallan en el Cuadro 3.2.

**Cuadro 3.2. Tratamientos para la fase de proliferación de brotes, IASA I, Ecuador, 2011.**

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>DOSIS</b>	<b>DESCRIPCIÓN mg.L<sup>-1</sup></b>
<b>T1</b>	Alta	2.0 BAP
<b>T2</b>	Media	1.3 BAP
<b>T3</b>	Baja	0.6 BAP
<b>T4 (Testigo)</b>	Nula	0

**Fuente:** Paucar M, 2011.

El testigo absoluto, será formulado con 3% de sucrosa sin la adición de 6- bencilaminopurina (BAP).

Aplicados los tratamientos y recopilados los datos, se realizó un análisis de varianza, posteriormente se hizo una prueba de Duncan al 5% para tratamientos, para determinar cuáles de los tratamientos reflejaron diferencias estadísticas significativas.

### **3.3.5.2. Variables evaluadas**

**Número de yemas brotadas:** Se contó las yemas brotadas de manera visual cada 7 días durante un mes.

**Días a la formación de yemas:** Se evaluó el número de días que transcurrieron desde la introducción de los brotes al medio de proliferación hasta el inicio de formación de las yemas.

### **3.3.6. Fase III: Enraizamiento *in vitro* y Aclimatación**

#### **3.3.6.1. Enraizamiento *in vitro***

Para el enraizamiento se utilizó un procedimiento investigado anteriormente en la carrera. Rubio (2010), recomienda para lograr un 100% de prendimiento: utilizar la Solución 1 con la adición de 7.38  $\mu\text{M}$  de ácido indolbutírico (IBA), ya que presentó un mayor porcentaje de desarrollo radicular y mayor longitud de las plántulas de mora de Castilla. La Solución 1 contiene la mitad de concentración (MS) de sales minerales y sustancias orgánicas, 75mg PVP, 50mg de ácido cítrico, 50mg ácido ascórbico. Esta fase duró 6 semanas y se la realizó en 6 recipientes plásticos, cada uno alojó 5 plántulas (Figura 3.11.).

#### **FOTO**



**Fuente:** Paucar M, 2011.

**Figura 3.11: Plantas en medio de enraizamiento, IASA I, Ecuador, 2011.**

Una vez finalizada la fase se evaluó el porcentaje de plantas enraizadas.

**Porcentaje de plantas enraizadas (%E):** Se evaluó visualmente, cada planta se la consideró enraizada si presentó al menos una raíz de 0.5 cm de largo y además si se encontró sana. Se contó el número de plantas que iniciaron la fase y se estableció una diferencia con el total de plantas enraizadas expresadas en porcentaje.

$$\% E = \frac{\text{número de plantas enraizadas}}{\text{número de plantas que iniciaron la fase}} * 100$$

### **3.3.6.2. Aclimatación de las plántulas**

La fase de aclimatación duró 6 semanas, consistió en tomar 27 plántulas enraizadas y colocarlas directamente en una bandeja de plástico con alvéolos, esta bandeja contuvo un sustrato con humus y fibra de coco 1:1. Una vez colocadas todas las plántulas en la bandeja se las cubrió totalmente con plástico a manera de un pequeño invernadero (Figura 3.12.). A partir de la segunda semana se empezó a perforar pequeños agujeros en el plástico, esta actividad se la realizó paulatinamente a medida que pasó el tiempo, cada vez se perforaron más grandes los agujeros para que las plántulas empiecen a acostumbrarse al ambiente, durante este periodo se añadió agua y fertilizante, finalmente se quitó el plástico totalmente a la cuarta semana.

**FOTO**

**Fuente:** Paucar M, 2011.

**Figura 3.12: Transplante y aclimatación, IASA I, Ecuador, 2011.**

Antes de trasplantar las plantas en fundas de 1 kg se preparó el sustrato con humus y fibra de coco 3:1, finalmente se colocó cada planta en una funda individual y estas se las llevo a invernadero. Este proceso de aclimatación duró dos semanas. Una vez finalizada la fase se evaluó la tasa de supervivencia.

**Tasa de supervivencia de plantas (% S):** Se contó el número de plantas trasplantadas del laboratorio a la zona de aclimatación (invernadero) y al final de la fase se estableció una diferencia con el total de plantas vivas expresadas en porcentaje.

$$\% S = \frac{\text{número de plantas vivas}}{\text{número de plantas que iniciaron la fase}} * 100$$

### 3.3.7. **Difusión de la Información**

Terminada la investigación se publicará el documento en el repositorio digital ESPE, recopilando toda la información y resultados que se obtuvo del presente estudio.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente investigación, realizada en mora de Castilla, se obtuvo una organogénesis directa de brotes a partir de explantes de hojas en la base del peciolo (Figura 4.1. y Figura 4.3.), lo que también se ha evidenciado en estudios similares realizados en *R. hybrida* por Dubois y de Vries (1995) y en otras variedades de rosa como akito (Narváez, 2009).

#### FOTO



**Fuente:** Paucar M, 2011.

**Figura 4.1. Brotes regenerados de mora de Castilla en el medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2011.**

La cantidad de luz también está ligada a los resultados obtenidos ya que como se menciona en estudios realizados en *Prunus persica* por Korban *et al.* (1992) y Miguel *et al.* (1996), citados por Gentile *et al.* (2002), señalan que la luz induce a la organogénesis.

Se ha demostrado en estudios realizados en muchas especies de la familia *Rosaceae*, en los que se resalta la eficacia y aumento de la regeneración de brotes mediante el uso de thidiazuron (TDZ) (Pati *et al.*, 2004). Según Zhou *et al.* (1994), el thidiazuron (TDZ) es responsable del rompimiento de la dormancia de los brotes, promueve la proliferación de brotes e induce la organogénesis *in vitro* en muchas especies. Según Lloyd *et al.*, citados por Pati *et al.* (2005), se ha realizado organogénesis directa en cultivos de *Rosa pérsica* a partir de hojas y raíces en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con BAP.

En el presente estudio en mora de Castilla, el thidiazuron (TDZ) si bien es cierto provocó un número considerable de brotes regenerados por ser una rosácea, el 6- bencilaminopurina (BAP) resultó más efectivo en lo que a número de brotes se refiere, hubo mayor crecimiento y número de brotes, esto se podría justificar porque el 6- bencilaminopurina (BAP), se encuentra entre una de las citoquininas más activas, Vijaya *et al.*, citado por Khosravi *et al.* (2007) señalan que el BAP es el biorregulador de crecimiento más efectivo en cuanto a la estimulación de brotes.

Pati *et al.* (2004), indican que en la fase de regeneración los explantes deben ser expuestos a un medio de inducción y a un medio de regeneración, no obstante, los resultados encontrados en este estudio demuestran que no es necesario, ya que hubo mayor formación de brotes en el medio de inducción en comparación con el de regeneración, para lo cual no sería práctico utilizar ambos medios, lo que se

corroborar con la investigación realizada por (Narváez, 2009) en *Rosa* sp. var akito. Por tal motivo no se determinó el tiempo más adecuado de la exposición de los explantes en medio de inducción. La información detallada en los cuadros para el análisis de la variable número de brotes regenerados, pertenece sólo al ensayo 3 (sin sucrosa) y al ensayo 4 (con la adición de sucrosa), ambos con el tiempo de exposición de los explantes de 28 días, puesto que fueron los ensayos que presentaron un mayor número de brotes (Cuadro 4.3. y Cuadro 4.7.). Hubo menor brotación a medida que disminuyó el tiempo de exposición, para el ensayo 1 con un tiempo de exposición de los explantes durante 14 días, la formación de brotes fue la menor de todos los ensayos.

#### **4.1. FASE I: REGENERACIÓN**

##### **4.1. 1. Efecto de 6- bencilaminopurina (BAP) y thidiazuron (TDZ) en el medio de inducción del cultivo de mora de Castilla.**

Al analizar el número de brotes regenerados de mora de Castilla en los ensayos 3 y 4 se detectaron diferencias estadísticas a nivel del 1% en los tratamientos, al igual que los biorreguladores y la comparación testigo vs resto. El resto de fuentes de variación no manifestaron diferencias estadísticas (Cuadro 4.1.).

**Cuadro 4.1. Análisis de variancia para el número de brotes regenerados en medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2011.**

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	# DE BROTES	
		E3	E4
TOTAL	20		
TRATAMIENTO	(6)	6.56 **	13.08 **
BIORREGULADOR	1	10.89 **	37.56 **
DENTRO B1 (TDZ)	(2)	0.35 ns	1.33 ns
D. LINEAL	1	0.67 ns	2.67 ns
D. CUADRÁTICA	1	0.00 ns	0.00 ns
DENTRO B2 (BAP)	(2)	1.44 ns	0.78 ns
D. LINEAL	1	2.67 ns	0.17 ns
D. CUADRÁTICA	1	0.22 ns	1.39 ns
TEST. Vs RESTO	1	19.01 **	27.21 **
ERROR	14	0.95	0.90
X (#)		2.67	3.57
CV (%)		36.60	26.63

**Fuente:** Paucar M, 2011.

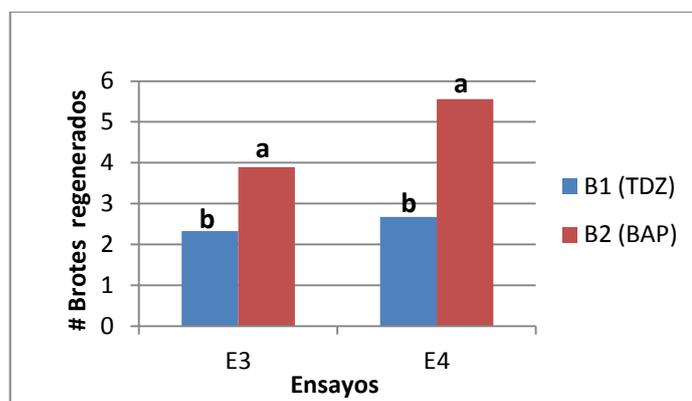
En el medio de inducción, el ensayo 4 suplementado con sucrosa la formación de brotes fue mayor en comparación con el ensayo 3 donde no hubo adición de sucrosa (Figura 4.1.). Según George (1996), esto se justifica debido a que sin la adición de sucrosa al medio, los explantes no tienen fuente de carbono que permita una adecuada multiplicación celular, por lo que se genera una menor formación de brotes.

En el análisis grupal el mejor biorregulador para regenerar brotes en medio de inducción fue el 6- bencilaminopurina (BAP) ya que tanto en los ensayos 3 y 4 el mayor promedio de brotes se presentó con este biorregulador, diferenciándose ambos estadísticamente (Cuadro 4.2. y Gráfico 4.1.).

**Cuadro 4.2. Promedios del número de brotes regenerados para los biorreguladores en medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2011.**

BIORREGULADORES	# DE BROTOS	
	E3	E4
B1 (TDZ)	2.33 b	2.67 b
B2 (BAP)	3.89 a	5.56 a

**Fuente:** Paucar M, 2011.



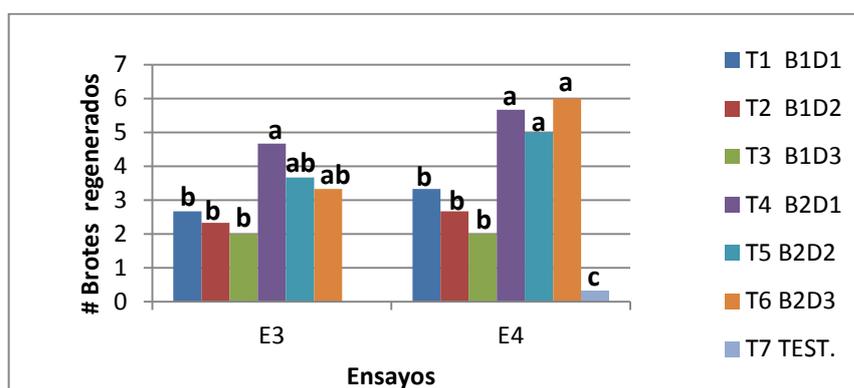
**Gráfico 4.1. Efecto de dos biorreguladores sobre el número de brotes regenerados en medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2011.**

La aplicación de los biorreguladores en medio de inducción fue eficiente pues todos los tratamientos superaron en el número de brotes al testigo. En el ensayo 3 el tratamiento que indujo una mayor formación de brotes en el peciolo de las hojas fue el T4 que consistió en 2.0 mg.L<sup>-1</sup> de 6- bencilaminopurina (BAP) y 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA). Mientras que en el ensayo 4 tanto T4, como T5 y T6 que consistieron en 2.0 mg.L<sup>-1</sup>, 1.5 mg.L<sup>-1</sup> y 1.0 mg.L<sup>-1</sup> de 6- bencilaminopurina (BAP) respectivamente con el mismo nivel 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA), indujeron una mayor formación de brotes en el peciolo de las hojas con relación a los demás tratamientos, diferenciándose estadísticamente (Cuadro 4.3. y Gráfico 4.2.).

**Cuadro 4.3. Promedios del número de brotes regenerados para los tratamientos en medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2011.**

TRATAMIENTOS	# DE BROTOS	
	E3	E4
T1 B1D1	2.67 b	3.33 b
T2 B1D2	2.33 b	2.67 b
T3 B1D3	2.00 b	2.00 b
T4 B2D1	4.67 a	5.67 a
T5 B2D2	3.67 a b	5.00 a
T6 B2D3	3.33 a b	6.00 a
T7 TEST.	0.00 c	0.33 c

Fuente: Paucar M, 2011.

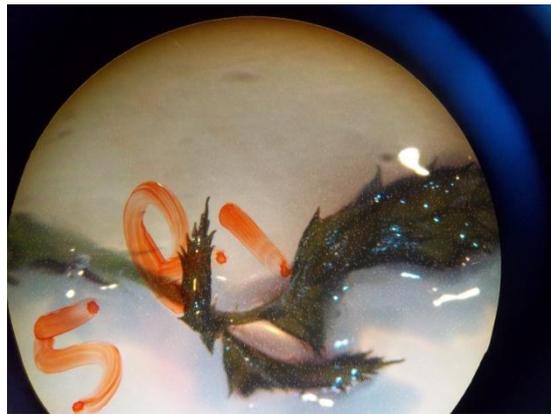


**Gráfico 4.2. Efecto de los tratamientos sobre el número de brotes regenerados en medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2011.**

La fenolización se caracterizó por un cambio en la coloración del tejido vegetal, pasando de color verde a café (Figura 4.2.). Se obtuvo un mayor número de explantes fenolizados en el tratamiento T7 (testigo), por no tener la adición de biorreguladores. En *Rosa damascena*, Pati *et al.* (2004) realizaron la adición de  $\text{AgNO}_3$  al medio, donde el  $\text{AgNO}_3$  es conocido por la acción inhibidora de la producción de etileno en tejidos vegetales, disminuyendo la senescencia de las hojas (Escaletes y Dosba, 1993); además se las mantuvo por 3 días en oscuridad (Dubois y de Vries, citado por Pati *et al.*, 2004), donde condiciones de oscuridad impiden la fenolización de los

explantes. En el presente estudio no se añadió el  $\text{AgNO}_3$  al medio, sino únicamente luego de introducidas las hojas en las cajas, se las mantuvo en obscuridad por 3 días, presentando buenos resultados al no producir una cantidad alta de explantes fenolizados.

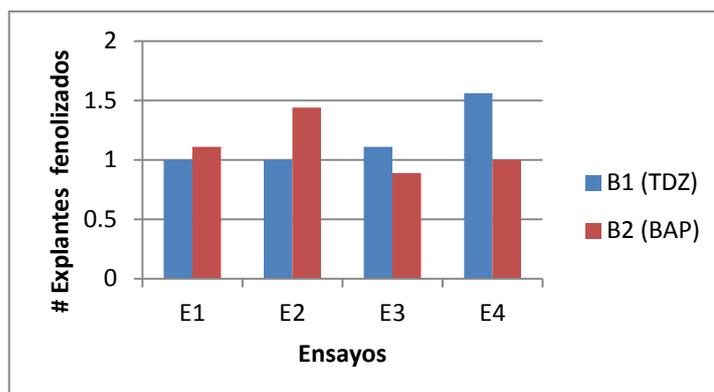
### FOTO



**Fuente:** Paucar M, 2011.

**Figura 4.2. Explantes fenolizados, IASA I, Ecuador, 2011.**

El número promedio de explantes fenolizados obtenidos de acuerdo al biorregulador utilizado en medio de inducción en los ensayos 1 y 2 fue menor para el biorregulador utilizado en medio de inducción en los ensayos 1 y 2 fue menor para el biorregulador thidiazuron (TDZ), mientras que en los ensayos 3 y 4 lo fue para el 6- bencilaminopurina (BAP), pese a no diferenciarse estadísticamente (Gráfico 4.3.).



**Gráfico 4.3. Efecto de dos biorreguladores sobre el número de explantes de hojas fenolizados en medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2011.**

Los promedios generales de días a la formación de brotes de mora en medio de inducción fueron de 7.00, 7.05, 7.24 y 5.86 para los ensayos 1, 2, 3 y 4 respectivamente. En la primera semana hubo vestigios de formación de brotes en todos los ensayos, con días promedios cercanos a 7 días en los ensayos 1, 2 y 3. Mientras el ensayo 4 presentó 5.86 días promedio a la formación de brotes, claramente esta diferencia con los demás ensayos es asumible a la adición de sucrosa.

#### **4.1. 2. Efecto de 6- bencilaminopurina (BAP) y thidiazuron (TDZ) en el medio de regeneración del cultivo de mora de Castilla.**

Al establecer los análisis de variancia para el número de brotes regenerados de mora de Castilla en medio de regeneración en el ensayo 3 se encontró diferencias estadísticas en los biorreguladores a un nivel del 5%, al igual que la comparación testigo vs resto que manifestó diferencias estadísticas al mismo nivel. En el ensayo 4 se encontró diferencias estadísticas en los tratamientos al igual que la comparación testigo vs resto a un nivel de 5%, mientras que los biorreguladores lo hicieron a un

nivel del 1%. El resto de fuentes de variación no manifestaron diferencias estadísticas (Cuadro 4.4.).

**Cuadro 4.4. Análisis de variancia para el número de brotes en medio de regeneración, IASA I, Ecuador, 2011.**

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	# DE BROTES	
		E3	E4
TOTAL	20		
TRATAMIENTO	(6)	3.60 ns	2.11 *
BIORREGULADOR	1	8.00 *	5.56 **
DENTRO B1 (TDZ)	(2)	1.44 ns	0.33 ns
D. LINEAL	1	0.17 ns	0.17 ns
D. CUADRÁTICA	1	2.72 ns	0.50 ns
DENTRO B2 (BAP)	(2)	0.78 ns	0.11 ns
D. LINEAL	1	1.50 ns	0.17 ns
D. CUADRÁTICA	1	0.06 ns	0.06 ns
TEST. Vs RESTO	1	7.01 *	4.75 *
ERROR	14	1.38	0.57
X (#)		1.62	1.33
CV (%)		72.58	56.69

**Fuente:** Paucar M, 2011.

### FOTO



**Fuente:** Paucar M, 2011.

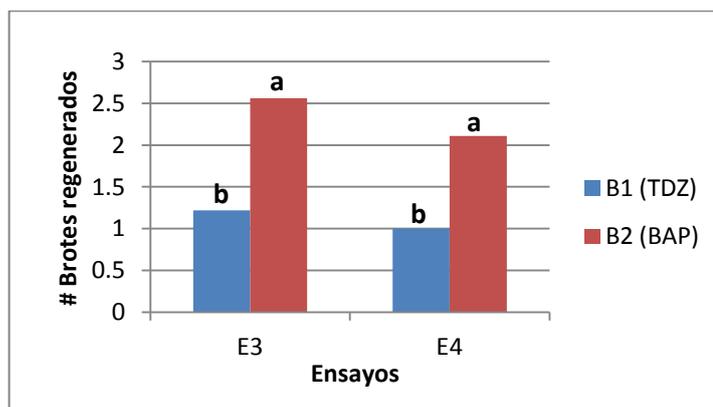
**Figura 4.3. Brotes de mora de Castilla en medio de regeneración, IASA I, Ecuador, 2011.**

En el análisis grupal el biorregulador que tuvo mejor resultado en la variable número de brotes en medio de regeneración fue el 6- bencilaminopurina (BAP) ya que en los ensayos 3 y 4 el mayor promedio de brotes se presentó con este biorregulador, en el ensayo 3 la formación de brotes fue mayor, diferenciándose estadísticamente (Cuadro 4.5. y Gráfico 4.4.).

**Cuadro 4.5. Promedios del número de brotes para los biorreguladores en medio de regeneración, IASA I, Ecuador, 2011.**

BIORREGULADORES	# DE BROTES	
	E3	E4
B1 (TDZ)	1.22 b	1.00 b
B2 (BAP)	2.56 a	2.11 a

**Fuente:** Paucar M, 2011.



**Gráfico 4.4. Efecto de dos biorreguladores sobre el número de brotes de mora de Castilla en medio de regeneración, IASA I, Ecuador, 2011.**

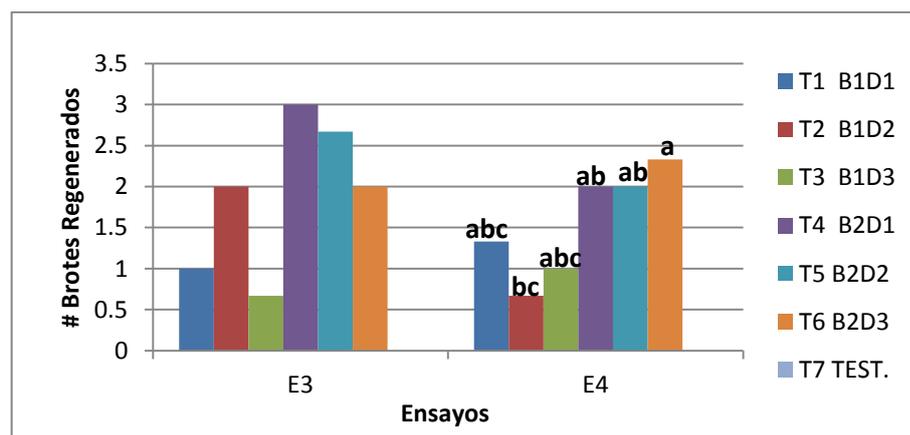
En el ensayo 4 los explantes provenientes del T6 que consistió en  $1.0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 6- bencilaminopurina (BAP) y  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido indolacético (AIA) fueron los que indujeron una mayor formación de brotes en el peciolo de las hojas, diferenciándose estadísticamente. Mientras que en el ensayo 3 lo fue el T4 que

consistió en 2.0 mg.L<sup>-1</sup> de 6- bencilaminopurina (BAP) y 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA), pese a no diferenciarse estadísticamente (Cuadro 4.6. y Gráfico 4.5.).

**Cuadro 4.6. Promedios del número de brotes para los tratamientos en medio de regeneración, IASA I, Ecuador, 2011.**

TRATAMIENTOS	# DE BROTES	
	E3	E4
T1 B1D1	1.00	1.33 a b c
T2 B1D2	2.00	0.67 b c
T3 B1D3	0.67	1.00 a b c
T4 B2D1	3.00	2.00 a b
T5 B2D2	2.67	2.00 a b
T6 B2D3	2.00	2.33 a
T7 TEST.	0.00	0.00 c

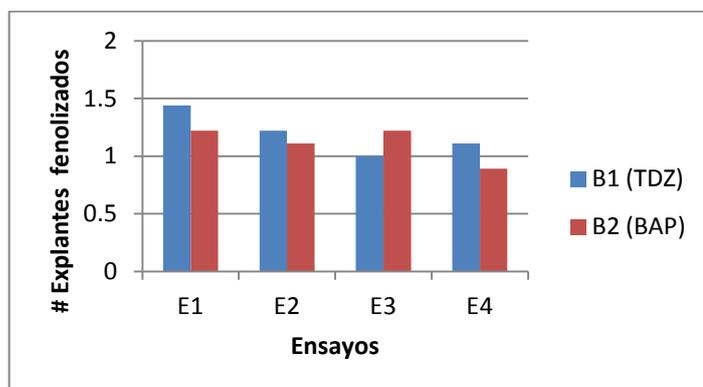
**Fuente:** Paucar M, 2011.



**Gráfico 4.5. Efecto de los tratamientos sobre el número de brotes de mora de Castilla en medio de regeneración, IASA I, Ecuador, 2011.**

El número promedio de explantes fenolizados obtenidos de acuerdo al biorregulador utilizado, fue mayor en los ensayos 1, 2 y 4 en medio de regeneración, donde los explantes provinieron del biorregulador thidiazuron (TDZ); mientras que

en el ensayo 3 los explantes que presentaron un mayor número promedio de explantes fenolizados fueron los provenientes del biorregulador 6- bencilaminopurina (BAP), pese a no diferenciarse estadísticamente (Gráfico 4.6.).



**Gráfico 4.6. Efecto de dos biorreguladores sobre el número de explantes de hojas fenolizados en medio de regeneración, IASA I, Ecuador, 2011.**

En la variable días a la formación de brotes en fase de regeneración, a diferencia del medio de inducción donde el ensayo 4 fue el que se tardó menos tiempo por tener a más de los biorreguladores la presencia de sucrosa (energía), en el medio de regeneración este ensayo fue el que necesitó un mayor tiempo debido que ya hubo un gran número de brotes en inducción de tal manera que para la fase de regeneración la brotación disminuyó notablemente y por ende el tiempo promedio para su formación aumentó. Los promedios generales de días a la formación de brotes de mora en medio de regeneración fueron de 5.67, 5.67, 6.33 y 8.33 para los ensayos 1, 2, 3 y 4 respectivamente. En la primera semana hubo vestigios de formación de brotes en los ensayos 1, 2 y 3, con días promedios cercanos a 6 días. Mientras que el ensayo 4 presentó 8.33 días promedio para la formación de brotes.

## 4.2. PRUEBAS HISTOLÓGICAS

Para estas pruebas se utilizaron los brotes que se obtuvieron en la fase de regeneración, en las diferentes fases de desarrollo de brotación (Figura 4.4.).

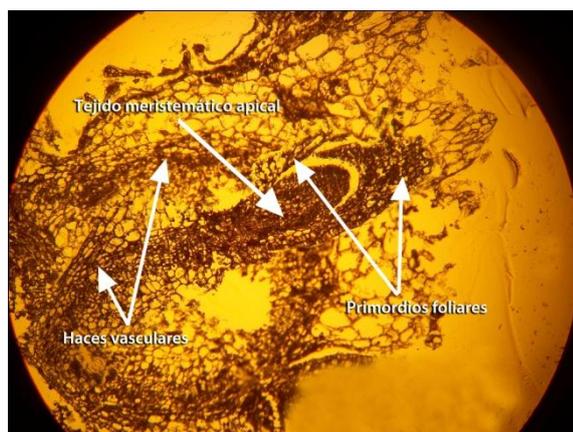
### ESQUEMA



**Fuente:** Paucar M, 2011.

**Figura 4.4. Esquema de brotación a partir los explantes de hojas en mora de Castilla, IASA I, Ecuador, 2011.**

Los brotes que se formaron en la base del peciolo de las hojas, fueron de organogénesis directa lo que se evidenció realizando pruebas histológicas (corte histológico de un brote) y observando al microscopio, donde existió la presencia de un ápice de crecimiento (tejido meristemático apical) rodeado de primordios foliares (Figura 4.5.).

**FOTO**

**Fuente:** Paucar M, 2011.

**Figura 4.5. Corte histológico de un brote regenerado de mora de Castilla, IASA I, Ecuador, 2011.**

### **4.3. FASE II: PROLIFERACIÓN DE BROTES**

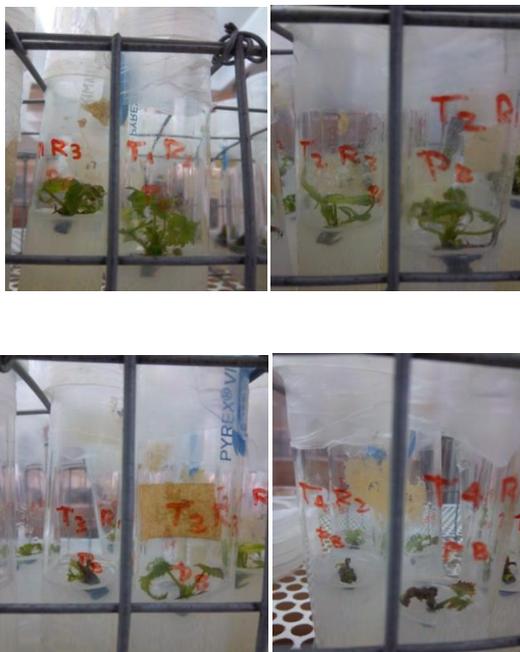
Al establecer los análisis de variancia para el número de yemas brotadas de mora de Castilla a los 14 días se encontró diferencias estadísticas al nivel del 5% para tratamientos, las dosis dentro del biorregulador 6- bencilaminopurina (BAP) se diferenciaron al mismo nivel manifestando una tendencia lineal, también hubieron diferencias estadísticas al nivel del 1% en la comparación testigo vs resto. A los 21 y 28 se encontró diferencias estadísticas al nivel del 1% para tratamientos, las dosis dentro del biorregulador 6- bencilaminopurina (BAP) se diferenciaron al mismo nivel manifestando una tendencia lineal, también hubo diferencias estadísticas al nivel del 1% en la comparación testigo vs resto. El resto de fuentes de variación no manifestaron diferencias estadísticas (Cuadro 4.7.).

**Cuadro 4.7. Análisis de variancia para el número de yemas brotadas, IASA I, Ecuador, 2011.**

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	# DE YEMAS BROTADAS			
		7 DÍAS	14 DÍAS	21 DÍAS	28 DÍAS
TOTAL	19				
TRATAMIENTO	(3)	0.33 ns	3.78 *	15.65 **	16.60 **
D. BAP LINEAL	1	0.40 ns	2.50 *	10.00 **	8.10 **
D. BAP CUADRÁTICA	1	0.00 ns	0.03 ns	0.13 ns	0.03 ns
TEST. Vs RESTO	1	0.60 ns	8.82 **	36.82 **	41.67 **
ERROR	16	0.20	0.45	0.35	0.33
X (#)		0.30	1.15	2.35	2.50
CV (%)		149.07	58.33	25.17	22.80

Fuente: Paucar M, 2011.

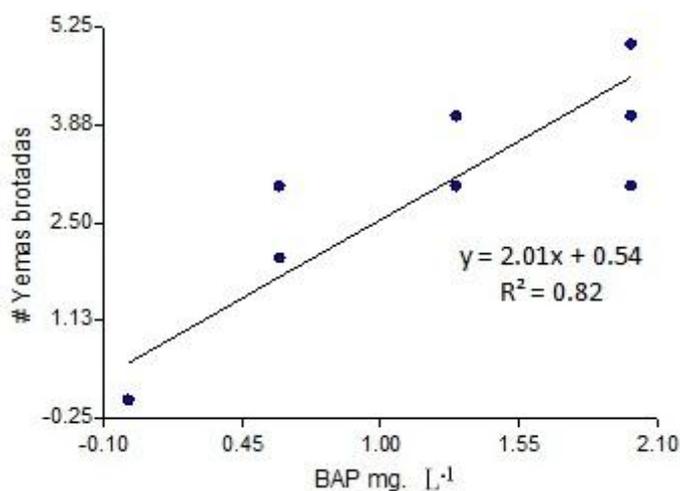
### FOTOS



Fuente: Paucar M, 2011.

**Figura 4.6. Yemas brotadas bajo el efecto de diferentes dosis de 6- bencilaminopurina (BAP), IASA I, Ecuador, 2011.**

Al establecer la ecuación de regresión lineal se observa en el Grafico 4.7., que mientras se incrementan las dosis de 6- bencilaminopurina (BAP), el número de brotes también aumenta. El coeficiente de determinación fue de 82 % lo que fortalece la aseveración indicada anteriormente.



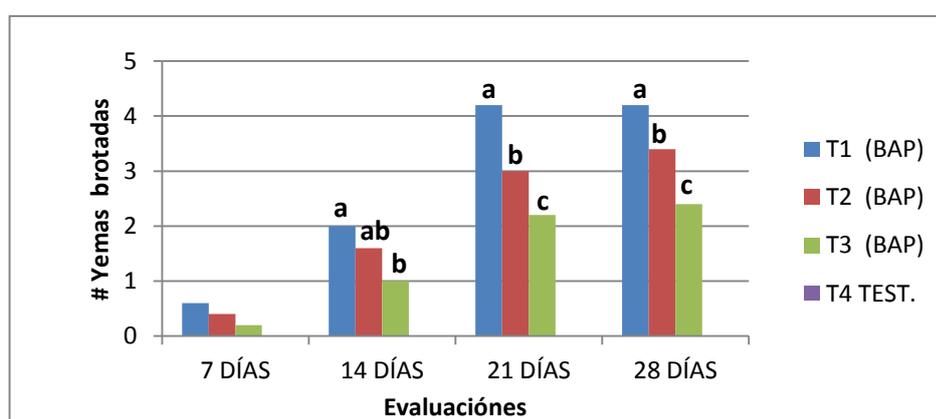
**Gráfico 4.7. Relación entre el número de yemas brotadas bajo el efecto de las diferentes dosis de 6- bencilaminopurina (BAP), IASA I, Ecuador, 2011.**

En los reportes de Vijaya *et al.*, citado por Khosravi *et al.* (2007), se observó que el BAP es el regulador de crecimiento más efectivo en cuanto a la estimulación de brotes, justificando los resultados encontrados en mora de Castilla en la fase de proliferación donde la aplicación del biorregulador 6- bencilaminopurina (BAP) fue eficiente pues en todas las dosis superó en el número de yemas brotadas al testigo. El T1 que consistió en 2.0 mg.L<sup>-1</sup> de 6- bencilaminopurina (BAP), provocó un mayor número de yemas brotadas en todas las evaluaciones y se encuentra ocupando el primer lugar del primer rango en la prueba de Duncan (Cuadro 4.8. y Gráfico 4.8.), la misma dosificación de 6- bencilaminopurina BAP obtenida en la investigación realizada por Narváez (2009) en *Rosa* sp. var akito.

**Cuadro 4.8. Promedios del número de yemas brotadas para los tratamientos, IASA I, Ecuador, 2011.**

TRATAMIENTOS (BAP)	# DE YEMAS BROTADAS			
	7 DÍAS	14 DÍAS	21 DÍAS	28 DÍAS
T1	0.60	2.00 a	4.20 a	4.20 a
T2	0.40	1.60 a b	3.00 b	3.40 b
T3	0.20	1.00 b	2.20 c	2.40 c
T4 TEST.	0.00	0.00 c	0.00 d	0.00 d

Fuente: Paucar M, 2011.



**Gráfico 4.8. Efecto de los tratamientos sobre el número de yemas brotadas en mora de Castilla, IASA I, Ecuador, 2011.**

El promedio general de los días a la formación de yemas en el T1 que consistió en 2.0 mg.L<sup>-1</sup> de 6- bencilaminopurina (BAP) fue 9.80 días, siendo el menor tiempo promedio; con el T2 que consistió en 1.3 mg.L<sup>-1</sup> de 6- bencilaminopurina (BAP) tardó 11.20 días; mientras que el tratamiento que demoró un mayor tiempo fue el T3 (dosis baja) que consistió en 0.6 mg.L<sup>-1</sup> de 6- bencilaminopurina (BAP) con 15.40 días.

#### 4.4. FASE III: ENRAIZAMIENTO Y ACLIMATACIÓN

El enraizamiento *in vitro* recomendado por Rubio (2010), tuvo un buen resultado para este protocolo, consiguiendo el 90 % de plantas enraizadas (Figura 4.7.).

#### FOTO



**Fuente:** Paucar M, 2011.

**Figura 4.7. Plantas de mora de Castilla enraizadas *in vitro*, IASA I, Ecuador, 2011.**

En fase de aclimatación (Figura 4.8.) las plantas mostraron el 88.88 % de supervivencia para este protocolo. La tasa de supervivencia obtenida en este estudio es aceptable y cercana a estudios similares en *Rosa damascena* que obtuvo el 90% (Pati *et al.*, 2004).

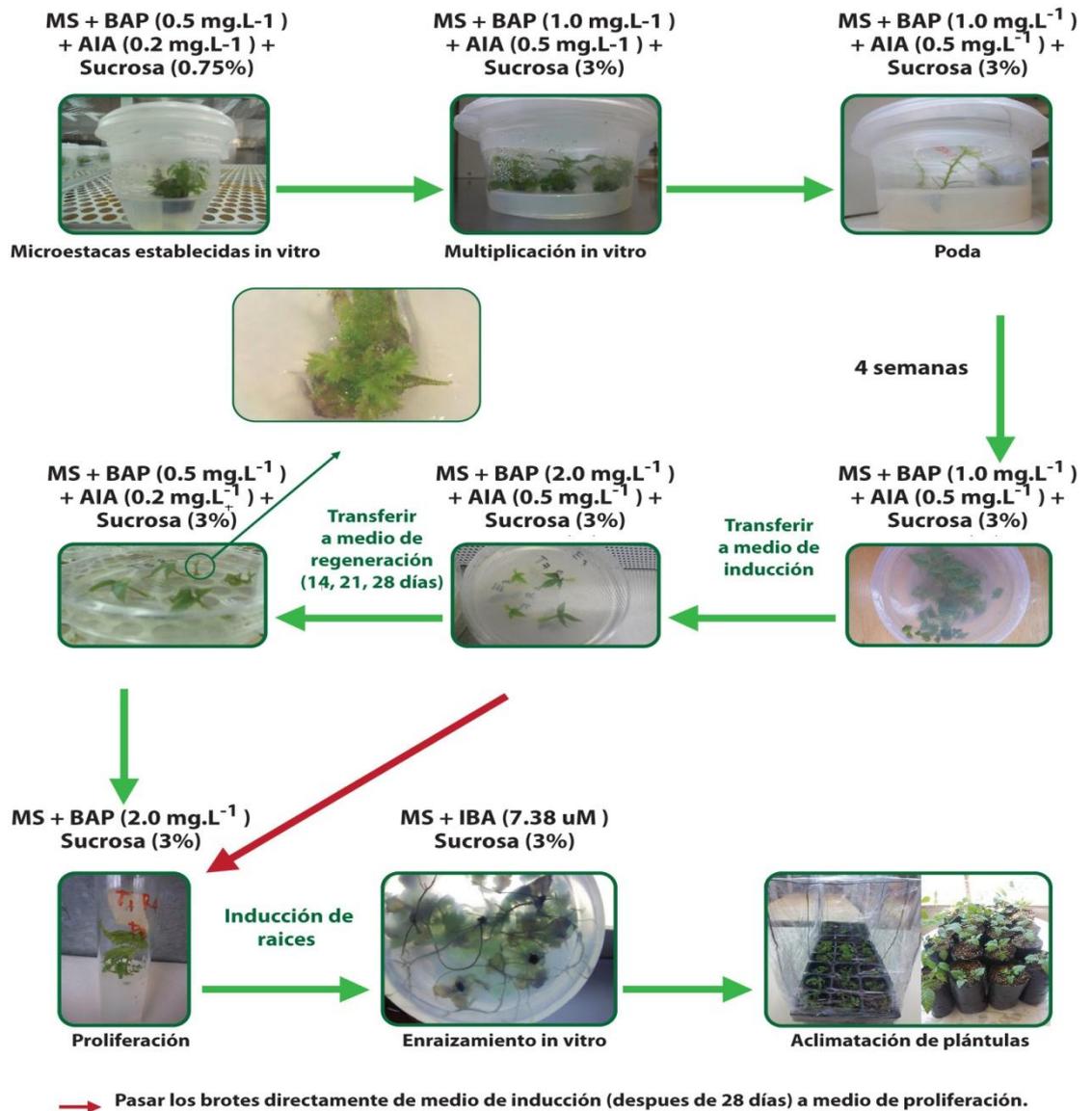
**FOTO**



**Fuente:** Paucar M, 2011.

**Figura 4.8. Plantas de mora de Castilla aclimatadas en funda, IASA I, Ecuador, 2011.**

## PROTOCOLO



Fuente: Paucar M, 2011.

Figura 4.9. Protocolo de organogénesis directa *in vitro* a partir de explantes de hojas en mora de Castilla, IASA I, Ecuador, 2011.

## V. CONCLUSIONES

- Las hojas provenientes de plantas *in vitro* de mora de Castilla, constituyen un excelente material vegetal para regeneración de brotes (organogénesis directa).
- Como hubo un mayor número de brotes regenerados en medio de inducción en comparación con el medio de regeneración, se concluye que no es necesario utilizar el medio de regeneración, sino utilizar sólo un medio donde se inducirán los explantes de hojas y también se regenerarán los brotes. El tiempo más adecuado de la exposición de los explantes en medio de inducción fue 28 días.
- El mejor biorregulador para regenerar brotes fue 6- bencilaminopurina (BAP) ya que obtuvo mayor cantidad de brotes regenerados en comparación con thidiazuron (TDZ).
- El efecto real de 6- bencilaminopurina (BAP) y ácido indolacético (AIA) para regeneración del mayor número de brotes en medios nutritivos sin sucrosa, se logró con dosis de  $2.0 \text{ mg.L}^{-1}$  y  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  respectivamente.

- El efecto de 6- bencilaminopurina (BAP) y ácido indolacético (AIA) para regeneración del mayor número de brotes en medios nutritivos con sucrosa, se logró con dosis de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de 6- bencilaminopurina (BAP) y  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido indolacético (AIA).
- En los explantes tratados tanto con thidiazuron (TDZ) como 6- bencilaminopurina (BAP), con y sin sucrosa se logró organogénesis directa, lo que se evidenció con los cortes histológicos.
- Con la dosis de  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  de 6- bencilaminopurina (BAP) se logró el mayor número de yemas brotadas en la fase de proliferación. La dosis de  $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$  de 6- bencilaminopurina (BAP) fue la que menor número de yemas generó.
- La mantención por 3 días en obscuridad, luego de introducidos los explantes de hojas en las cajas *petri*, evita la fenolización y garantiza un mejor desarrollo los brotes.

## VI. RECOMENDACIONES

- En el medio de inducción se recomienda la dosificación de  $2.0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 6- bencilaminopurina (BAP) y  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido indolacético (AIA) ya que permiten obtener estadísticamente el mayor número de brotes.
- Es importante en medio de inducción la mantención por 3 días en obscuridad, luego de introducidos los explantes de hojas en las cajas *petri*, para evitar la fenolización y tener un desarrollo óptimo de los brotes.
- Para la obtención de buenos cortes histológicos, es recomendable el uso de etanol y xileno antes de la inclusión de los brotes en cera de parafina.
- Este sistema de propagación *in vitro* (organogénesis directa) es una técnica complementaria a la micropropagación por estacas *in vitro* debido a que permite incrementar el aprovechamiento del material vegetativo, consiguiendo un mayor número de plantas.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

Arbeláez, L. 2008. Micropropagación de *Rubus glaucus* Benth sin agujones en medio sólido y por inmersión temporal. (En línea). Consultado 30 de ene. 2011. Disponible en:

<http://www.utp.edu.co/investigacion/proyectos/detalleProyectoHTML.php?cod=740>

Bejarano, W. 1992. Manual de mora *Rubus glaucus* Benth. Proexant. Quito, Ecuador. p.5.

Calva, G. 2005. Cultivo de células vegetales. Revista Digital Universitaria. (En línea). Vol.6, No.11 ISSN: 1607 – 6079. México D.F. Consultado 06 feb. 2011. Disponible en:

<http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/art104a-1a.htm>

Casaca, A. 2005. Guías Tecnológicas de Frutas y Vegetales. (En línea). Consultado 03 de nov. 2011. Disponible en:

<http://www.zamorano.edu/gamis/frutas/mora.pdf>

Centro Agrícola de Quito. 1992. Convenio CAF. Manual técnico del cultivo de la mora de Castilla. Quito, Ecuador. p.3.

Cisne, J., Muñoz Ll. y Reyes H. 2005. Reguladores de crecimiento, L-cisteína y ácido ascórbico en el cultivo *in vitro* de mora (*Rubus glaucus* Benth), (En línea). Consultado 03 nov. 2011. Disponible en:

<http://cenida.una.edu.ni/calera/calera8/tema10.pdf>

De Neergaard, E. 1997. Methods in Botanical Histopathology. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. p. 35 – 43

Hermosilla, F. 2011. Cultivo *in vitro* en especies del género *Pinus*. (En línea). Consultado 08 feb. 2011. Disponible en:

<http://www.sabetodo.com/contenidos/EpyyFIFZupIwUPORRc.php>

Herrera, L y Bravo, B. 2010. Aislamiento, selección, cinética y conservación de los mejores microorganismos, aislados del mosto de vino de mora de Castilla *Rubus glaucus* Benth. (En línea). Consultado 06 feb. 2011. Disponible en:

<http://www.scribd.com/doc/27092415/tesis-cap-1-y-cap-2>

Huaranca, R. 2008. Morfogénesis *in vitro*. (En línea). Consultado 06 de feb. 2011. Disponible en:

<http://www.unapiquitos.edu.pe/intranet/pagsphp/docentes/archivos/Morfogenesis.ppt?PHPSESSID=3b1ff48e55175de2343513968b6cd1bc>

INEC-MAG-SICA. 2003. III Censo Nacional Agropecuario. Resultados nacionales y provinciales. p.107.

INIAP. 2008. Nuevas tecnologías para el cultivo de mora. (En línea). Consultado el 03 de nov. 2011. Disponible en:

<http://www.dicyt.com/noticias/nuevas-tecnologias-para-el-cultivo-de-mora>

Marulanda, M. 2001. Establecimiento *in vitro* de heliconias con fines de producción masiva. Scientia et Technica Año x, No 26, Diciembre 2001. UTP. ISSN 0122-1701

Mendoza, O. 2009. Cultivo de mora de Castilla. (En línea). Consultado 06 feb. 2011. Disponible en:

<http://syesid.blogspot.com/2009/08/cultivo-de-mora-de-castilla.html>

Monteiro, M. 2004. Berries del Uruguay. (En línea). Consultado 30 de ene. 2011. Disponible en:

<http://usuarios.netgate.com.uy/cmonteiro/moras.htm>

Mosquera, N. 2007. Cultivo vegetal. (En línea). Consultado el 08 feb. 2011.

Disponible en:

<http://natalyosquera.blogspot.com/>

Muñoz I. y Reyes H. (2006). Efecto de reguladores de crecimiento, L-cisteína y ácido ascórbico en el cultivo *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth). (En línea). Consultado 03 nov. 2011. Disponible en:

<http://cenida.una.edu.ni/Tesis/tnf01m967.pdf>

Pati, P.K., Rath S.P., Sharma M., Sood A. y Ahuja PS. 2005. *In vitro* propagation of rose – a review. (En línea). Consultado 10 nov. 2010. Disponible en:

[http://www.aseanbiotechnology.info/scripts/count\\_article.asp?Article\\_code21018038](http://www.aseanbiotechnology.info/scripts/count_article.asp?Article_code21018038)

Pati, P.K., Sharma M., Sood A. y Ahuja PS. 2004. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Rosa Damascena* Mill. *BioOne* 2010 US/Canada, Volume 40, Issue 2, March 2004 pp. 192-195.

Pérez, J. 2009. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales en *Phaseolus* sp. (En línea). Consultado 08 feb. 2011. Disponible en:

<http://www.monografias.com/trabajos67/cultivo-tejidos-vegetales/cultivo-tejidos-vegetales2.shtml?monosearch>

Pérez, P. 2011. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. (En línea). Consultado 26 nov. 2011. Disponible en:

[http://www.ecured.cu/index.php/Organog%C3%A9nesis\\_%28Biotecnolog%C3%ADa\\_Vegetal%29](http://www.ecured.cu/index.php/Organog%C3%A9nesis_%28Biotecnolog%C3%ADa_Vegetal%29)

Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Departamento de horticultura, Universidad de Agricultura de Wageningen de Holanda. Madrid, España. p. 15, 35, 143.

Proyecto SICA. 2006. Producción de la mora a nivel nacional. (En línea). Consultado 16 feb. 2011. Disponible en:

<http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/11442/1/CAPITULO%201.doc>

Ramírez, T. 2009. Perfil de mercado mora. CORPEI. (En línea). Quito, Ecuador. Consultado 30 ene. 2011. Disponible en:

<http://www.pucesi.edu.ec/pdf/mora.pdf>

Reina, C. 1998. Manejo postcosecha y evaluación de la calidad para la mora de Castilla (*Rubus glaucus*) que se comercializa en la ciudad de Neiva. Consultado 21 mar. 2011. Disponible en:

<http://201.234.78.28:8080/dspace/bitstream/123456789/864/1/Manejo%20poscosecha%20y%20evaluacion%20de%20la%20calidad%20de%20la%20mora.pdf>

Rojas, S; García, J; Alarcón, M. 2004. Propagación asexual de plantas, CORPOICA, Ministerio de agricultura y Desarrollo rural de Colombia, PRONATA. Colombia.

Ruiz, J. 1999. Morfogénesis *in vitro*. (En línea). Consultado 06 feb. 2011. Disponible en:

[http://165.98.8.3/conferencias\\_2Taller/Morfogenesis\\_in\\_vitro.pdf](http://165.98.8.3/conferencias_2Taller/Morfogenesis_in_vitro.pdf)

Saavedra, G. 2008. Estructuras de hormonas vegetales. Departamento de Suelos y Recursos Naturales. Facultad de Agronomía. Universidad de Concepción. (En línea). Consultado 14 abr. 2011. Disponible en:

<http://www.cienciaahora.cl/Revista21/07EstructurasHormonasVegetales.pdf>