



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE: INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA**

AUTOR: CHRISTIAN IVÁN ZAPATA MALDONADO

**TEMA: EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EXPLANTES DE MORA
SIN ESPINA "*Rubus glaucus Benth*" EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN
VEGETATIVA EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL**

DIRECTOR: ING. PABLO LANDÁZURI

CODIRECTOR: ING. MARCO TAIBE

SANGOLQUÍ, JULIO 2014

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

CHRISTIAN IVÁN ZAPATA MALDONADO

Declaro que:

El perfil de tesis de graduación “EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MORA SIN ESPINA “*Rubus glaucus Benth*” EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL” 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 de su contenido, veracidad y alcance científico.

Sangolquí, Abril del 2013

Christian Iván Zapata Maldonado

CERTIFICACIÓN

Ing. Pablo Landázuri

Ing. Marco Taipe

Certifican:

Que el trabajo titulado “EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MORA SIN ESPINA “*Rubus glaucus Benth*” EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL”, realizado por CHRISTIAN IVÁN ZAPATA MALDONADO, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

El mencionado trabajo consta de (un) documento empastado y (un) disco compacto, el cual contiene los archivos en forma portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a CHRISTIAN IVÁN ZAPATA MALDONADO que lo entregue a la ING. GRACE TATIANA PÁEZ BARRERA, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí

Ing. Pablo Landázuri

DIRECTOR

Ing. Marco Taipe

CODIRECTOR

AUTORIZACIÓN

Yo, CHRISTIAN IVÁN ZAPATA MALDONADO

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MORA SIN ESPINA “*Rubus glaucus Benth*” EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí

Christian Iván Zapata Maldonado

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia Hugo, Mari, Gaby y Sebas, que me han brindado su apoyo incondicional cada día de mi vida.

A mis amigos por compartir momentos especiales de amistad y aprendizaje durante todo el tiempo que hemos pasado juntos, especialmente a Susi, Andrey, Vale y Rosita.

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento especial a Dios por darme la vida, la salud, el trabajo y la fortaleza necesarios para salir adelante y llegar a culminar una etapa más de mi vida.

A la empresa Agrobiotech, por haberme permitido realizar esta tesis en sus instalaciones y a mis compañeras de trabajo por su amistad.

A mi director y codirector de tesis el Ingeniero Pablo Landázuri y el Ingeniero Marco Taipe, por su paciencia y generosidad al compartir su tiempo y conocimientos para llegar a feliz término con esta tesis.

A mis amigos que al compartir ideales semejantes han contribuido para que se haga realidad el cumplimiento de una meta más.

A mis maestros y autoridades de la Carrera de Biotecnología por sus conocimientos impartidos durante este caminar por la vida universitaria.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	i
CERTIFICACIÓN	ii
AUTORIZACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO 1:	17
EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EXPLANTES DE MORA SIN ESPINA " <i>Rubus glaucus Benth</i> " EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN VEGETATIVA DE UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL.....	17
1.1. Antecedentes y formulación del problema	17
1.2. Justificación del problema	19
1.3. Objetivos de la investigación.....	23
1.3.1. Objetivo general del proyecto	23
1.3.2. Objetivos específicos	23
1.4. Marco teórico	24
1.4.1. Generalidades de la mora.....	24

1.4.2.	Clasificación botánica	25
1.4.3.	Descripción Botánica	25
1.4.3.1.	Raíz	26
1.4.3.2.	Tallo.....	26
1.4.3.3.	Hojas	26
1.4.3.4.	Flores	27
1.4.3.5.	Fruto	27
1.4.4.	Diversidad genética	28
1.4.5.	Variedades.....	28
1.4.6.	Propagación de la mora.....	29
1.4.6.1.	Propagación asexual	29
	Acodo.....	30
	Estacas	30
	Micropropagación	31
1.4.7.	Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.....	32
1.4.8.	Hormonas	33
1.4.8.1.	Auxinas.....	34
1.4.8.2.	Citoquininas.....	37
1.4.8.3.	Giberelinas	40
1.4.8.4.	Retardantes de crecimiento.....	40
1.4.9.	Medios de cultivo	41

1.4.9.1. Cultivo en medio semisólido	41
1.4.9.2. Cultivo en medio líquido	42
1.4.10. Etapas de la micropropagación clonal in vitro	42
ETAPA 0: Selección del material vegetal	43
ETAPA 1: Establecimiento del cultivo aséptico	44
ETAPA 2: Inducción de brotes	45
ETAPA 3: Multiplicación de brotes	46
ETAPA 4: Enraizamiento y elongación.....	47
1.4.11. Sistema de inmersión temporal	47
1.4.11.1. Importancia del SIT ante la micropropagación	49
1.4.11.2. El valor de la herramienta desarrollada	51
1.4.11.3. Parámetros que afectan la eficiencia del Sistema de Inmersión Temporal.51	
1.4.11.4. Funcionamiento del SIT.....	52
CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA	54
2.1. Selección de la dosis óptima de BAP o BAP+PBZ en medio de cultivo líquido en inmersión parcial.	54
2.1.1. Recolección y transporte del material vegetal.....	54
2.1.2. ETAPA 1: Desinfección del material vegetal.....	54
2.1.3. ETAPA 2: Introducción del material in vitro.....	55
2.1.3.1. Preparación del medio de cultivo para introducción	55

2.1.3.2. Siembra del explante en el medio de cultivo.....	56
2.1.4. ETAPA 3: Multiplicación de los brotes en sistema de inmersión parcial.	56
2.1.4.1. Preparación del medio de cultivo líquido para multiplicación.....	56
2.1.4.1. Selección y siembra de explantes en el medio de cultivo.....	57
2.2. Evaluación de tres tiempos de ciclo en la producción de explantes de mora sin espina <i>Rubus glaucus Benth</i> , en la fase de multiplicación en el SIT.	58
2.2.1. ETAPA 3: Multiplicación de los brotes en sistema de inmersión temporal.....	58
2.2.1.1 Preparación del medio de cultivo líquido para multiplicación.....	58
2.2.4.2. Siembra del explante en el medio de cultivo.....	58
2.3. Programación del SIT	60
2.4. Diseño estadístico.....	61
2.4.1. Unidad experimental	62
2.242. Análisis.....	63
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	64
3.1. Selección de la dosis optima de BAP o BAP+PBZ en medio de cultivo líquido en inmersión parcial para la multiplicación de mora sin espina <i>Rubus glaucus Benth</i>	64

3.2. Evaluación de tres tiempos de ciclo de inmersión temporal y de la producción, para los explantes de mora sin espina <i>Rubus glaucus Benth</i> , en la fase de multiplicación del SIT.....	67
3.3. Análisis de costos	72
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	78
4.1. Selección de la dosis óptima de BAP o BAP+PBZ en medio de cultivo líquido en inmersión parcial para la multiplicación de mora sin espina <i>Rubus glaucus Benth</i>	78
4.2. Evaluación de tres tiempos de ciclo de inmersión temporal y de la producción, para los explantes de mora sin espina <i>Rubus glaucus Benth</i> , en la fase de multiplicación del SIT.....	80
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	86
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	87
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Concentración de paclobutrazol utilizado en el pretratamiento de multiplicación de mora sin espina <i>Rubus glaucus Benth</i> , en un Sistema de Inmersión Parcial.	57
Tabla 2 Factores a usar en el DCA.	61
Tabla 3 Tratamientos utilizados en el arreglo factorial en un DCA.	61
Tabla 4 ANOVA de la inmersión parcial para las tres variables analizadas en el ensayo de inmersión parcial.	64
Tabla 5 Prueba de Duncan. Variables analizadas en el ensayo de inmersión parcial	65
Tabla 6 Análisis de varianza de las variables peso fresco, longitud del brote, número de hojas por brote y índice de producción.	67
Tabla 7 Prueba de Duncan. Medias (Tiempo de ciclo del biorreactor) de las variables índice de producción, peso fresco, longitud del brote y número de hojas por brote.	69
Tabla 8 Prueba de Duncan. Medias (Medio de cultivo de introducción) de las variables índice de producción, peso fresco, longitud del brote y número de hojas por brote.	70
Tabla 9 Prueba de Duncan. Medias (Interacción Tiempo de ciclo-medio de introducción) de las variables índice de producción, peso fresco, longitud del brote y número de hojas por brote.	70

Tabla 10 Costos de equipos, herramientas, materiales e insumos (reactivos para 1.05 L de medio de cultivo) empleados en la fase de multiplicación de mora sin espina <i>Rubus glaucus Benth</i> en el SIT.	74
Tabla 11 Costos de los equipos, herramientas, materiales e insumos (reactivos para 1.05 L de medio de cultivo) que se emplean en la fase de multiplicación de mora sin espina <i>Rubus glaucus Benth</i> de forma convencional.	75
Tabla 12 Costo de recursos básicos por mes.	76
Tabla 13 Salario por recurso humano.	76
Tabla 14 Análisis de comparativo de gastos entre la multiplicación de mora en el SIT y de forma convencional.	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Distribución de las zonas más productoras de mora del Ecuador.	17
Figura 2 Estructura de algunas auxinas naturales (IAA, IBA,PAA, CI-IAA) y sintéticas (NAA, dicamba,2,4-D y 2,4,5-T).....	35
Figura 3 Rutas de biosíntesis de citocininas a partir de DAMPP y 5'-AMP. Las reacciones muestran la defosforilación de los intermediarios nucleótidos y la formación de bases libres derivadas de adenina.	38
Figura 4 Sistema de inmersión temporal (SIT)	53
Figura 5 Sistema de inmersión temporal (SIT)	59
Figura 6 Biorreactores en el Sistema de Inmersión Temporal.	60
Figura 7 Regresión lineal polinómica de la concentración de CULTAR.	67
Figura 8 Brotes obtenidos en cada uno los tiempos de ciclo propuestos en esta investigación (Tiempos de ciclo: 12 horas, 15 horas y 18 horas).....	69

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Medias (Interacción Tiempo de ciclo-medio de introducción) de las variables peso fresco, longitud del brote, número de hojas por brote y índice de producción.	71
---	----

RESUMEN

Estudios señalan que en el Ecuador ha aumentado la demanda de la mora de castilla (mora sin espina) en 3%, debido a que esta planta se encuentra relacionada con un mayor número de ramas productoras y un macollamiento entre 15% y 20% superior a la mora tradicional con espina, por tal razón aparece la necesidad de aumentar la multiplicación *Rubus glaucus Benth*, se plantea en este trabajo la utilización de tecnologías que abaraten y estimulen el uso de plantas obtenidas en los campos, mediante la reducción de los costos de producción por planta, para lo cual es necesario aumentar los índices de multiplicación y disminuir los costos de los medios de cultivo. Para suplir esta necesidad, se realizó cultivo *in vitro*, utilizando el Sistema de Inmersión Temporal para evaluar la dependencia de la producción de mora de castilla *Rubus glaucus Benth* en la fase de multiplicación vegetativa con relación a la frecuencia del SIT que fue de 12, 15, y 18 horas; y con respecto al medio de cultivo de introducción del cual provinieron los explantes iniciales para el SIT. Como resultado se obtuvo que el mejor tratamiento para multiplicación de mora fue a tiempo de ciclo de 12 horas y medio de cultivo de introducción sólido; además, al realizar el análisis económico del proyecto se determinó que al multiplicar la mora sin espina en el SIT aumenta la producción con relación a la propagación tradicional y por ende disminuye los costos de producción, obteniendo una relación de ganancia de 5:1.

Palabras clave: Mora sin espina, tiempo de ciclo, paclobutrazol, micropropagación, Sistema de Inmersión Temporal.

ABSTRACT

Studies indicate that in Ecuador has increased the demand for Mora de Castilla (blackberry boneless) in 3%, because this plant is found associated with an increased number of branches producing and tillering between 15% and 20% higher than traditional mora with spina, for that reason has been the need to increase existing *Rubus glaucus* Benth multiplication, we propose in this paper the use of technologies that cheapen and encourage the use of plants grown in the fields, by reducing the production costs per plant, which is necessary to increase the rates of multiplication (IM) and lower costs of the culture media. To supply this need, this project work with culture in vitro was performed using the system temporary immersion to evaluate the dependence of the production of mora de castilla *Rubus glaucus* Benth in the phase of vegetative propagation with respect to time of the SIT cycle were 12, 15, and 18 hours; and with respect to the input medium which came the initial explants for SIT. As a result it was found that the best treatments for a good development of new growth to be derived from the multiplication phase in the SIT are: cycle time of 12 hours and medium solid introduction; also to make the project economic analysis determined that multiplying Mulberry boneless SIT increases in production relative to traditional propagation and thus reduces production costs, resulting in a gain ratio of 5:1.

Keywords: Blackberry boneless, cycle time, paclobutrazol, micropropagation, Temporary Immersion System.

CAPÍTULO 1:

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EXPLANTES DE MORA SIN ESPINA "*Rubus glaucus Benth*" EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN VEGETATIVA DE UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL

1.1. Antecedentes y formulación del problema

La mora se encuentra distribuida en el Ecuador a lo largo de todo el callejón interandino, especialmente en las provincias de Azuay, Tungurahua, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Imbabura y Carchi (Ramírez, 2009), como se observa en la Figura 1.



Figura 1 Distribución de las zonas más productoras de mora del Ecuador.

Fuente: INEC 2000

La mora es una fruta muy apetecida tanto en el mercado nacional como internacional. Rica en vitaminas y minerales, la mora tiene un gran futuro como producto de exportación en forma congelada y fresca, una vez que los productores puedan superar los problemas de transporte, ya que por su alta perecibilidad, requiere de especiales cuidados en cosecha y transporte (Ramírez, 2009).

Los principales destinos de las exportaciones ecuatorianas de mora en el periodo 2004-2008 han sido Estados Unidos, España, Antillas Holandesas, Alemania y Holanda. Estados Unidos es el principal socio comercial ecuatoriano captando un 56% de las exportaciones totales de mora (Ramírez, 2009).

El segundo mercado más importante para el Ecuador es España que en promedio ha receptado el 20% de las exportaciones de mora en valores FOB (Miles USD). La mora de origen ecuatoriano también llega a otros países dentro de la Unión Europea como Bélgica y República Checa pero en cantidades menores (Ramírez, 2009).

La mora de Castilla contiene problemas de productividad en Ecuador, por el uso de propagación tradicional. Según Monteiro (2004), la mora es propagada por métodos vegetativos como: estacas y acodos; estos tipos de procesos facilitan la diseminación de plagas y enfermedades que afectan la calidad y cantidad de la producción y consecuentemente incrementan la

pérdida económica para el productor; mientras que por el método *in vitro*, se obtendría un gran número de brotes a partir de cantidades mínimas de tejido (Pati, Sharma, Sood, & Ahuja, 2004).

Ecuador se encuentra en pleno crecimiento en el ámbito agropecuario; constantemente se están desarrollando nuevas producciones comerciales, gracias a sus condiciones agroclimáticas.

1.2. Justificación del problema

Estudios señalan que en el Ecuador ha aumentado la demanda de la mora de castilla (mora sin espina) en 3%, debido a que esta planta se encuentra relacionada con un mayor número de ramas productoras y un macollamiento entre 15% y 20% superior a la mora tradicional con espina (Sigarroa & García, 2011). El crecimiento promedio de la mora ecuatoriana vendida al exterior en el periodo 2004-2008 es de 18.8%, en referencia a toneladas exportadas, este crecimiento en el mismo periodo es de 82.1% (Ramírez, 2009).

La producción de mora de castilla se destina tanto para la elaboración de conservas como para el consumo en producto fresco, por lo que es importante avanzar en el cultivo, que según el tipo de poda, puede ser de solo seis a siete meses o durante los 12 meses del año (ABT, 2010); por lo que requiere aumentar la producción de la mora de castilla.

La mora registra problemas de productividad en Ecuador, debido al uso de sistemas de propagación tradicionales. Según Monteiro (2004) mencionado por Paucar (2011), la mora es propagada por métodos vegetativos. Tradicionalmente tiene dos sistemas: estaca y acodo (Huanca, 1991), 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, Sharma, Sood, & Ahuja, 2004).

En función de la necesidad existente de aumentar la multiplicación *Rubus glaucus Benth*, se plantea explorar tecnologías que abaraten y estimulen el uso de plantas obtenidas en los campos, y permitan obtener plantas libres de enfermedades y de mejor calidad, además que permitan la reducción de los costos de producción por planta, para lo cual es necesario aumentar los índices de multiplicación (IM) y disminuir los costos de los medios de cultivo. Tomando en cuenta estos factores, se puede decir que la forma de propagación adecuada será el cultivo *in vitro* (CIRAD, 2003).

El término genérico “cultivo de tejidos vegetales” involucra a diferentes técnicas de cultivo de material vegetal diverso, incluyendo a los protoplastos (células desprovistas de su pared celular), células, tejidos, órganos y plantas completas. Mediante éstas y otras técnicas de cultivo, es posible obtener plantas libres de microbios en un medio nutritivo aséptico (estéril) en condiciones ambientales controladas. También se lo conoce como “cultivo *in vitro* de plantas” por realizarse en recipientes de vidrio (CIRAD, 2003).

En mora, existen reportes de micropropagación *in vitro*, Arabeláez (2008) publicó el protocolo de micropropagación de *Rubus glaucus Benth* en medio sólido y por inmersión temporal; en la mayoría de casos se trabaja con regeneración indirecta (formación de callos), donde la variación somaclonal es más frecuente. Sin embargo hay muy pocos estudios en organogénesis directa, la misma que es de gran ayuda para propagar plantas élites sin generar variabilidad genética (Paucar, 2011).

En esta investigación, se usó una de las técnicas de cultivo *in vitro* que es la micropropagación. Se emplearon el Sistema de Inmersión Temporal (SIT), que aparte de abaratar costos de producción y solucionar las dificultades de los cultivos estáticos, despliegan la posibilidad de automatizar algunas etapas del cultivo *in vitro*, permiten mayor facilidad de escalado y aumentan los índices de multiplicación, desarrollo y productividad del material propagado (Pérez, Ponce, Jiménez, & Agramonte, 1998).

Los SIT pueden aplicarse en la propagación masiva de plantas élites, mediante organogénesis o embriogénesis somática, para incrementar los coeficientes de multiplicación en comparación con las formas convencionales de propagación *in vitro* (cultivo en medio sólido o líquido semi-sumergido o sumergido) (CIRAD, 2003).

Es por esto, que la automatización de una, o más etapas de los procesos de micropropagación es una opción para la reducción de costos de manipulación, reducción del espacio e incremento de volúmenes de producción (Aharoni, 2002).

Los biorreactores pueden proveer un sistema rápido y eficiente para la micropropagación de plantas por medio de la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro*, tales como la inducción de organogénesis directa en medio líquido (Colmenares & Giménez, 2005).

Las ventajas que presenta este sistema sobre el cultivo en medios líquido son entre otras, mejor manejo sobre las condiciones del cultivo, contacto directo del explante con el medio de cultivo, un óptimo y continuo suplemento de reguladores de crecimiento y nutrientes a los explantes (Filgueira, 2010).

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general del proyecto

Evaluar la producción de explantes de mora sin espina *Rubus glaucus Benth* en la fase de multiplicación vegetativa del sistema de inmersión temporal.

1.3.2. Objetivos específicos

Seleccionar la dosis óptima de BAP o BAP+PBZ en medio de cultivo líquido en inmersión parcial para la multiplicación de mora sin espina *Rubus glaucus Benth*, a fin de establecerla en el sistema de inmersión temporal.

Evaluar tres tiempos de ciclo de inmersión temporal, para los explantes de mora sin espina *Rubus glaucus Benth*, en la fase de multiplicación del SIT.

Analizar financiera y económicamente el costo de la producción de la mora de Catilla sin espina *Rubus glaucus Benth* en la fase de multiplicación en el sistema de inmersión temporal.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Generalidades de la mora

En todo el mundo existen alrededor de 400 especies que pertenecen al género de moras y frambuesas (*Rubus*), siendo la mayoría de ellas originarias de las regiones templadas y frías de América del Norte y Europa, a pesar de que muchas especies están en estado silvestre en Centro América, no se puede aseverar que son nativas de esta región (OIRSA, 2003).

El botánico alemán W.O. Focke, quien estudió la sistemática de la mora, afirma que la mayoría de las especies son nativas de las zonas templadas del hemisferio norte. De las especies europeas y americanas, se cree que la mayoría fueron separadas por los movimientos glaciares durante la edad de hielo (Bejarano, 1992).

Se han encontrado, en estado silvestre, plantas del género *Rubus sp.*, especialmente de mora de Castilla en los Andes Ecuatorianos donde crece en forma individual, dispersa o formando grupo con otras variedades, además, en 1921, ya se encontraron pequeñas plantaciones de esta mora cultivadas en Ibarra, Otavalo, Quito y Ambato (Popenoe, 1921).

1.4.2. Clasificación botánica

Según Muñoz, 1986, su clasificación botánica es:

Reino:	Vegetal
División:	Antofita
Clase:	Dicotiledónea
Subclase:	Arquiclamidea
Orden:	Rosales
Familia:	Rosaceae
Género:	Rubus
Especie:	Glaucus
Nombre científico:	<i>Rubus glaucus Benth</i>
Nombre vulgar:	Mora

1.4.3. Descripción Botánica

La mora es una planta silvestre, perenne, arbustiva, semi erecta y con tallos rastreros o semi erguidos que forman macollas. Las inflorescencias se presentan en racimos terminales que poseen de 15 a 22 flores, aunque en ocasiones, se ubican en las axilas de las hojas (Cárdenas, 2013).

1.4.3.1. Raíz

Las raíces se distribuyen en los primeros 30 centímetros del suelo dispuestos horizontal y longitudinalmente de 0.5 a 1.2 metros de largo. Las raíces a más de sostener la planta permiten su propagación al presentar yemas vegetativas capaces de activarse produciendo brotes (León, 1987).

1.4.3.2. Tallo

Esta planta emite ramas o cañas de tallo corto, formando una macolla hasta de cinco metros de diámetro. Las ramas y hojas presentan superficie lisa y el reverso de las hojas están cubiertos de una cera blancuzca que le da el tono característico a esta especie (León, 1987). Mide de 1.5 a 2.5 cm de diámetro, pueden ramificarse y emiten constantemente brotes en la base. El color del tallo varía del cenizo al rojo, algunas están cubiertos de un polvillo azul blanquecino y otros de color verde y café oscuro, cuando están maduros son leñosos (Cárdenas, 2013).

1.4.3.3. Hojas

Las hojas tienen tres folíolos, dos basales casi opuestos y uno terminal. La forma de los folíolos varía mucho, de oval a elíptica: con bordes que son

finamente aserrados y en el pecíolo y lado inferior de la hoja hay espinas curvas y agudas (León, 1987). Su dimensión varía de 5 a 12 cm de largo, acuminados y aserrados, verde oscuro en el haz, y blanquecino en el envés (Cárdenas, 2013).

1.4.3.4. Flores

Las flores brotan en racimos terminales. El perianto se compone de cáliz de cinco sépalos agudos y persistentes y corola de unos 2.5 cm de diámetro, con cinco pétalos blancos o rosados y caedizos. El perianto está inserto en un receptáculo o hipantio, de cuya base en forma de disco salen muchos estambres, y que se prolongan hacia arriba en un cuerpo cónico, en el que están insertados numerosos carpelos (León, 1987). Las flores miden de 2 a 2.5 cm de diámetro y se disponen en racimos en las puntas de las ramas. Las ramas florecen en racimos terminales (Cárdenas, 2013).

1.4.3.5. Fruto

El fruto resulta del desarrollo conjunto de los carpelos y del hipantio: los primeros están llenos de líquido rojo o morado, ácido y de sabor agradable y contiene semillas diminutas. Los tejidos del hipantio, son más suaves y menos jugosos. Los frutos de *Rubus glaucus* miden de dos a tres

centímetros de largo y su perfil varía de circular a elíptico (León, 1987). Además, está compuesto por 70 a 100 drupas que se adhieren al receptáculo y, dentro de cada drupa hay una semilla, y cada fruto posee de 100 a 120 semillas. La producción de fruto es continua, aunque presentan épocas de mayor producción en intervalos de 5 a 6 meses (Cárdenas, 2013).

1.4.4. Diversidad genética

El género *Rubus* comprende alrededor de 250 especies, sin contar con varias agamospecies (producción de semillas asexualmente) del género *R. fruticosus* (Romolerux, 1996).

Las moras de origen andino son las siguientes: “mora criolla” *R. floribundus*, “mora de gato” *R. gigantus*, “mora silvestre” *R. adenotrichos*, *R. uticaefolius*, *R. trichomallus*, *R. roseus*, *R. macrocarpus benth*, *R. shankai standl*, “mora de cerro” *R. bogotensis* y “mora de castilla” *R. glaucus Benth* (Romolerux, 1996).

1.4.5. Variedades

Según De la Cadena y Orellana (1985), Bejarano (1992) y Martínez *et al.* (2007), las variedades cultivadas en Ecuador son: Mora de castilla: planta

autóctona (98% de la superficie plantada con *Rubus glaucus*), con mayor importancia comercial, Olallie: liberada por la estación experimental de Oregón, y Brazos: liberada por la estación experimental Texas (More *et al.*, 1993).

En el Ecuador, dentro de las variedades comerciales, las más importantes son la de Castilla y, en los últimos años, la Brazos proveniente de Texas, la cual es apta para la exportación por su alta productividad. (Martínez, et al., 2007).

1.4.6. Propagación de la mora

1.4.6.1. Propagación asexual

Muchas plantas tienen la capacidad de reproducirse asexualmente, ya sea por regeneración de órganos vegetativos como raíces y tallos o por semillas apomícticas (semillas con embriones donde el origen es totalmente materno y provienen de tejido diploide que rodea el saco embrionario) (Huanca, 1991).

Entre las desventajas de la reproducción asexual tenemos la desaparición de ese genotipo en cambios ambientales desfavorables. Muchas plantas que se reproducen asexualmente, intermitentemente utilizan

la reproducción sexual, esto es para producir nuevos genotipos y que pueda ocurrir selección natural (Huanca, 1991).

Artesanalmente, la propagación de la mora se realiza por acodos y estacas. A pesar de ser la micropropagación otra forma de propagación asexual, tiene muchas ventajas.

Acodo

El acodo es un método de propagación en el cual se provoca la formación de raíces adventicias a un tallo que está todavía adherido a la planta madre. Luego, el tallo enraizado, acodo, se separa para convertirlo en una nueva planta que crece sobre sus propias raíces (Huanca, 1991).

El acodado puede considerarse como una preparación para divisiones subsecuentes. Puede ser un medio natural de reproducción como en la frambuesa o puede inducirse por los métodos “artificiales” que se describen más adelante (Huanca, 1991).

Estacas

En la propagación por estacas, una parte del tallo, de la raíz o de la hoja se separa de la planta madre, se coloca bajo condiciones ambientales

favorables y se le induce a formar raíces y tallos, produciendo así una nueva planta independiente, que en la mayoría de los casos es idéntica a la planta de la cual procede (Huanca, 1991).

Micropropagación

La micropropagación es una técnica de propagación vegetativa basada en la capacidad que poseen las células vegetales de dividirse y de regenerar órganos y plantas enteras. La propagación vegetativa es en la que sin participación de los organelos reproductores de la planta, por medio de estímulos de la inducción de yemas axilares se da lugar a nuevos brotes. Además es una propagación clonal (clon es un organismo o grupo de organismos que derivan de otro a través de un proceso de reproducción asexual (Huanca, 1991)) ya que la formación de yemas axilares asegura la producción de plantas conformes genéticamente al tipo original (Marin Velazquez, 1997).

La micropropagación es un proceso que utiliza técnicas de cultivo *in vitro*, en las que se selecciona explantes, se desinfecta, y, artificialmente, se le otorga condiciones para que sus células manifiesten su totipotencialidad (Rodrigo, 2009), se controla la composición y concentración de sus componentes en el medio de cultivo, además las condiciones ambientales (luz, temperatura, humedad relativa) que se mantienen a unos niveles óptimos para el crecimiento (Marin Velazquez, 1997).

La técnica de micropropagación se usa como mecanismo para multiplicar plantas desde partes de ellas, que otros sistemas de propagación no son capaces de utilizar (Rodrigo, 2009). Como la multiplicación es rápida y a gran escala, se obtienen beneficios en ahorro de tiempo y de recursos. En efecto, 1m² de plantas en el laboratorio puede representar una hectárea en el campo; la tasa de crecimiento es exponencial y el material obtenido es uniforme (Rodrigo, 2009).

1.4.7. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

El avance alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular, y en condiciones de laboratorio es posible actualmente reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Este principio general se aplica también al cultivo *in vitro* de plantas (Stewart, 2008).

La expresión cultivo *in vitro* de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes), y el control de los factores que afectan el crecimiento.

Sería recién en la década del 50 cuando se determina la importancia del balance hormonal en las plantas, con el descubrimiento de las hormonas vegetales más usadas en la actualidad.

1.4.8. Hormonas

Son menos de diez las fitohormonas que se encuentran en las plantas tanto en terrestres como en acuáticas de agua dulce. La presencia de hormonas en diferentes concentraciones en la planta y sus células, permite éstas desarrollen morfologías distintas, los cuales se dan de acuerdo del grado de ontogenia. Las células en crecimiento por acción de varias hormonas expresan división y elongación celular; sin embargo, bajo condiciones *in vitro*, se ha observado que las células inician procesos de diferenciación bajo ciertos niveles hormonales (Jordán & Casaretto, 2006).

La presencia de niveles relativamente altos de citocininas y auxinas conduce a una multiplicación celular con escasa diferenciación, al contrario, si se combinan diferentes niveles de auxinas y citocininas pueden darse varias respuestas alternativas. Si existe un nivel relativamente alto de citocininas vs. auxinas, se genera formación de nuevos brotes; si por el contrario, los niveles hormonales se invierten y tuviéramos un nivel relativamente algo de auxinas vs. citocininas, se originan raíces (Jordán & Casaretto, 2006).

1.4.8.1. Auxinas

Hormonas asociadas con los tejidos de intensa división, especialmente en meristemas apicales de tallos y raíces, hojas jóvenes y frutos en desarrollo. Esto ocurre también en hojas maduras y ápices de raíces, aunque en menor proporción (Soberón, Quiroga, Sampietro, & Vattuone, 2005).

La forma predominante en las plantas es el ácido indolacético (AIA), presente en concentraciones nanomolares. Otras formas naturales de auxinas son el ácido 4-cloro-indolacético (4-Cl-IAA), ácido fenilacético (PAA), ácido indol butírico (IBA) y el ácido indol propiónico (Jordán & Casaretto, 2006).

Síntesis y degradación

Las auxinas se encuentran en las regiones que están en crecimiento activo. La síntesis de AIA ocurre principalmente en meristemas apicales, hojas jóvenes y frutos en desarrollo.

Las plantas usan dos rutas para sintetizar AIA, una dependiente del triptófano (Trp) y otra independiente de él. La síntesis de AIA puede derivar

del triptófano por cuatro vías: por descarboxilación para producir triptamina, por oxigenación para originar indolacetamida, por transaminación para producir ácido indol-3-pirúvico y por oxigenación para producir indol-3-acetaldoxima (Figura 2) (Jordán & Casaretto, 2006).

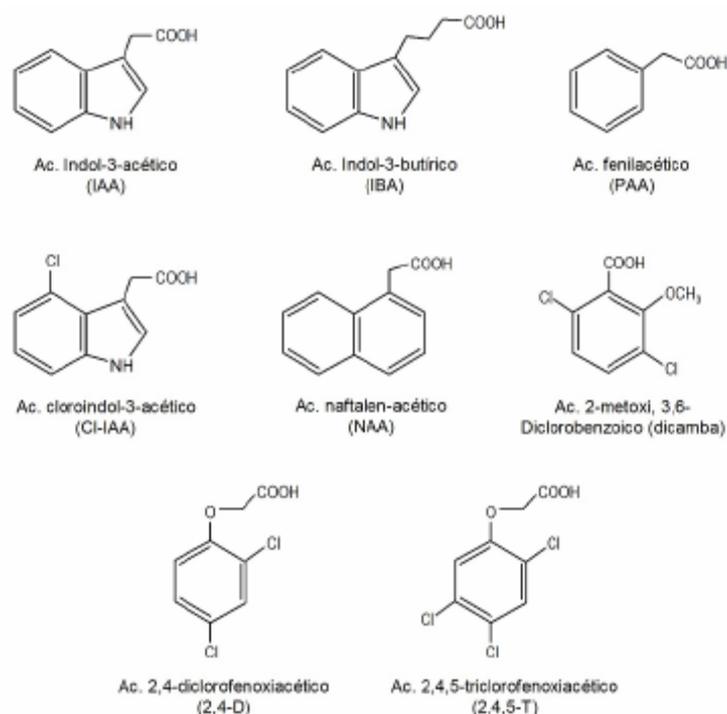


Figura 2 Estructura de algunas auxinas naturales (IAA, IBA,PAA, Cl-IAA) y sintéticas (NAA, dicamba,2,4-D y 2,4,5-T)

Fuente: Jordán & Casaretto, 2006

Transporte de auxinas

La mayor parte de auxinas que se producen en las hojas maduras viaja al resto de la planta en forma pasiva y apolar por el floema; una vez que se

encuentra en el tejido receptor, el transporte ocurre a través de las células de forma polar, activa, unidireccional e implica consumo energético. El gradiente de pH entre la pared celular ($\text{pH}\approx 5$) y el citoplasma ($\text{pH}\approx 7$) facilita la entrada de la forma reducida del IAA (Jordán & Casaretto, 2006).

Efectos fisiológicos de las auxinas

Las auxinas influyen en la división, crecimiento y diferenciación celular. Además de estimular el crecimiento de los tallos, inhiben el crecimiento de la raíz primaria, pero estimulan la formación de raíces secundarias. Las auxinas promueven la biosíntesis de la hormona etileno que inhibe el crecimiento radicular. Las auxinas promueven la dominancia apical, reprimiendo el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo; ayudan al desarrollo de flores y frutos (Jordán & Casaretto, 2006).

Mecanismo de acción

Las auxinas promueven el crecimiento de las plantas por aumento de la expansión celular. Según el “efecto ácido”, las auxinas estimulan la actividad de la bomba de protones (H^+ -ATPasa) localizada en la membrana plasmática a través de la activación de bombas preexistentes y por inducción de síntesis de nuevas H^+ -ATPasas. La extracción de protones hacia la pared

celular genera una reducción del pH lo que a su vez activa proteínas que rompen enlaces de hidrógeno entre los constituyentes de la pared. Los candidatos directos son las expansinas que son proteínas que favorecen la plasticidad de la célula (Jordán & Casaretto, 2006).

1.4.8.2. Citoquininas

Hormonas reguladoras de crecimiento que influyen en la división celular, que se derivan de adenina o aminopurinas. Entre sus efectos fisiológicos está la promoción de la división celular, la formación y crecimiento de brotes laterales, la maduración de los cloroplastos, la movilización de nutrientes hacia las hojas y retraso de la senescencia (Soberón, Quiroga, Sampietro, & Vattuone, 2005).

Síntesis, degradación y transporte

Las citocininas son hormonas esenciales en varios procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas. Las citocininas naturales son generadas por las plantas a partir de DMAPP (vía del ácido mevalónico) y 5'AMP y su síntesis sucede principalmente en la raíz, aunque también en el meristema apical y en semillas inmaduras (Figura 3). Los reguladores

sintéticos como BA, kinetina o TDZ, son más potentes que las hormonas naturales (zeatina, *trans*-zeatina o isopentiladenina), debido a que las artificiales no pueden ser degradadas o metabolizadas por el tejido. TDZ es considerado uno de los inductores más potentes en la formación de nuevos brotes o embriones somáticos tanto en plantas leñosas como herbáceas (Jordán & Casaretto, 2006).

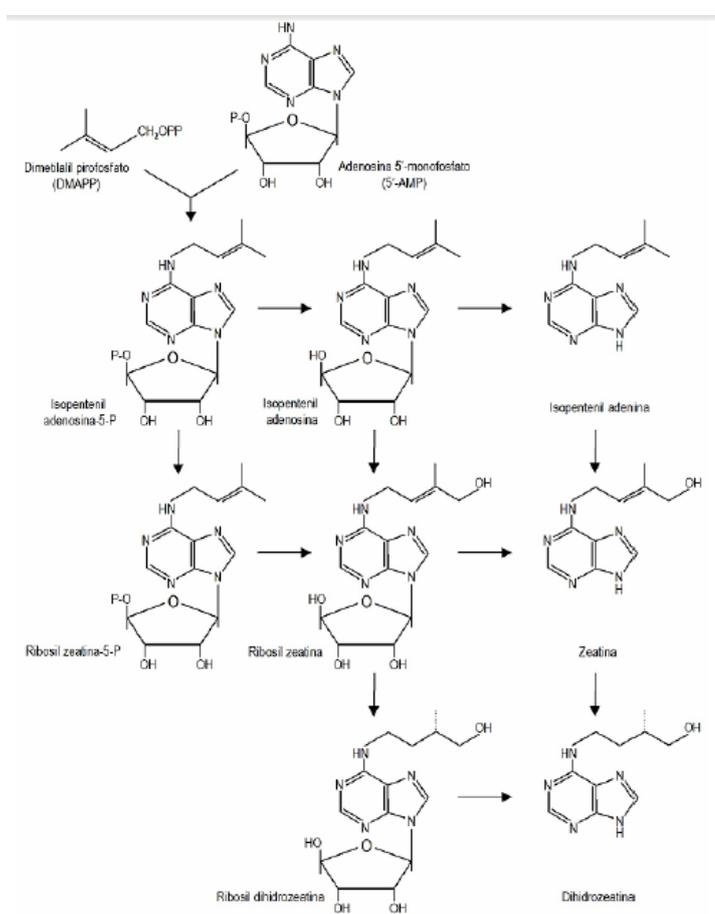


Figura 3 Rutas de biosíntesis de citocininas a partir de DAMPP y 5'-AMP. Las reacciones muestran la defosforilación de los intermediarios nucleotídicos y la formación de bases libres derivadas de adenina.

Fuente: Jordán & Casaretto, 2006

Las citocininas se localizan en el floema y xilema y su presencia se considera como una posible señal vinculada con el déficit de nutrientes en el suelo.

Efectos fisiológicos

Las citocininas promueven la división celular estimulando la progresión del ciclo. En la fase de G1, inducen la acumulación de ciclinas y por tanto promueven un nuevo ciclo celular.

Provocan la iniciación de brotes, organogénesis y androgénesis(individuo con la mitad de la dotación cromosomal), son las hormonas claves para inducir la formación de nuevos brotes en diversos explantes *in vitro*. Junto a auxinas, promueven la producción de callos, de los cuales es posible inducir la formación de brotes y raíces, como también de embriones somáticos.

Un efecto de la citocinina es retardar la senescencia de las hojas. Las citocininas permiten el desarrollo de cloroplastos en oscuridad, reemplazando parcialmente la demanda de luz.

1.4.8.3. Giberelinas

Son sustancias promotoras del crecimiento. Provocan la elongación de tallos debido al alargamiento de las células más que a un incremento de la división celular, ya que aumenta la extensibilidad de la pared celular (Soberón, Quiroga, Sampietro, & Vattuone, 2005).

1.4.8.4. Retardantes de crecimiento

Los retardantes de crecimiento actuales son compuestos orgánicos sintéticos que retrasan la división y alargamiento celular en tejidos del brote en activo crecimiento, sin provocar malformaciones en los tallos o en las hojas. Villegas & Lozoya (1991) manifiestan que los retardantes de crecimiento actúan en la oxidación del kaureno a ácido laurenoico para la producción de giberelinas, de esta forma se reduce la tasa de división y expansión celular, sin el riesgo de causar toxicidad. Las consecuencias morfológicas se muestran en la reducción del crecimiento, pero también se manifiesta un estímulo en la producción de flores en algunas especies (Alcaraz, Ruvalcaba, Villegas, & Tafoya, 2008).

Los triazoles son extremadamente activos y efectivos para retardar la altura de plantas a muy bajas concentraciones. El paclobutrazol es un

derivado de la pirimidina que se ha usado para reducir el rompimiento de las raíces en plántulas para trasplante y hacerlas más compactas (Alcaraz, Ruvalcaba, Villegas, & Tafoya, 2008). Se ha reportado al PBZ como inhibidor de la síntesis de giberelinas, capaz de retardar el crecimiento de cultivos e incrementar su resistencia al estrés, por lo que presenta potencial para mejorar la aclimatación de algunas plantas (Torres & Mogollón, 2002), también reduce la absorción de agua durante la proliferación celular, disminuye la vacuolización y los espacios intercelulares, acortando los tallos y reduciendo el tamaño de la hoja, induciendo a la formación de brotes en agrupaciones (Ziv, 1990).

1.4.9. Medios de cultivo

1.4.9.1. Cultivo en medio semisólido

Son aquellos medios a los cuales se agrega un agente gelificante y son ampliamente usados en el establecimiento de explantes. (George, 1993). El agente solidificante más usado es el agar. El explante se mantiene estático sobre el medio, con sólo uno de sus extremos en contacto por donde se realiza la absorción de nutrientes (Lorenzo, et al., 1998).

Aunque se usa ampliamente, este medio presenta una serie de desventajas como: la baja tasa de multiplicación en algunas especies y

cultivares, la necesidad de cambiar el medio periódicamente por el agotamiento de nutrientes, y la necesidad de lavar el agar de las raíces antes de trasladar las plántulas al sustrato.

1.4.9.2. Cultivo en medio líquido

La utilización de este sistema da como resultado mayores tasas de crecimiento que en medios sólidos, debido a la mayor superficie de contacto del explante con el medio y a las menores gradientes de difusión entre el medio y el explante, lo que facilita la absorción de nutrientes (George, 1993). Además se logra mayores tasas de crecimiento, mayor superficie de contacto, toma de nutrientes y reguladores más eficiente y dispersión más efectiva de metabolitos tóxicos. La inmersión continua de los tejidos en el medio de cultivo provoca síntomas de stress por oxidación y vitrificación (Damiano, Gentile, La Starza, Frattarelli, & Monticelli, 2003).

1.4.10. Etapas de la micropropagación clonal in vitro

Los principios básicos de la técnica de micropropagación son iguales en los diferentes tipos de plantas, y fueron descritos por Murashige (1974) en un esquema que consta de tres fases diferenciadas, con requerimientos nutritivos, hormonales y ambientales diferentes:

Etapa 1: Establecimiento del cultivo

Etapa 2: Multiplicación de propágulos

Etapa 3: Restablecimiento de las plantas al suelo

En la micropropagación clonal *in vitro* de plantas se considera cuatro etapas o pasos según (Harisha, 2007):

ETAPA 0: Selección del material vegetal

Dos factores son particularmente importantes en el establecimiento del cultivo: el explante y la esterilización.

La elección del tipo de explante puede ser determinante para el éxito del establecimiento del cultivo. En la micropropagación de frutales, los más adecuados son los ápices de tallo y las yemas axilares (Marin Velazquez, 1997).

El cultivo de una planta inicia de cualquier parte de la misma y su estado fisiológico representa una mayor influencia en su respuesta al inicio del cultivo de tejidos, (Harisha, 2007). Por eso existen ciertas consideraciones que se deben resaltar para la selección del explante: la planta madre debe estar saludable, fuera del estado de senescencia y libre de signos de enfermedad por patógenos, teniendo en cuenta que un tejido joven contiene una proporción más alta de células en división por lo que al iniciar en tejido desdiferenciado su tasa de crecimiento será mayor (Harisha, 2007).

ETAPA 1: Establecimiento del cultivo aséptico

Una vez tomados los explantes y antes de ser introducidos en el medio de cultivo hay que eliminar todas las esporas de hongos y bacterias que tienen en su superficie. El grado de esterilización dependerá del estado de la planta origen. Si las plantas han crecido en el exterior, la presencia de gérmenes será mayor que si se han cultivado en invernadero (Marin Velazquez, 1997).

Esta etapa corresponde a la obtención de un cultivo aséptico del material vegetal con el que se va a trabajar, por lo que se debe realizar el proceso de desinfección al explante para tratar de eliminar la presencia de microorganismos que pudieran destruir el cultivo a consecuencia de la competencia por los nutrientes del medio de cultivo (Roca & Mroginski, 1993).

La desinfección se puede realizar con varios agentes químicos, entre ellos están el etanol a una concentración del 70% v/v, hipoclorito de sodio a 0.5% hasta 3% v/v, entre otros (Roca & Mroginski, 1993). Además se puede colocar tensoactivos como el Tween 80 o 20 para disminuir la tensión superficial del agua y permitir que el explante reciba una mejor desinfección.

Se recomienda realizar enjuagues con agua destilada para eliminar residuos del agente químico en los explantes posterior a la desinfección

realizada con las diferentes soluciones desinfectantes (Roca & Mroginski, 1993).

Cada especie de planta requiere de protocolos específicos de desinfección, dependiendo también del tipo de explante que se vaya a utilizar. Incluso algunos requieren de mecanismos físicos además de los químicos para asegurar su desinfección.

Entre los factores que se toma en cuenta para garantizar una buena desinfección son: el método, la concentración y el tiempo de inmersión en las soluciones agentes químicos desinfectantes al que se los someta al explante (Roca & Mroginski, 1993).

ETAPA 2: Inducción de brotes

Después de la etapa de desinfección del material vegetal y la preparación del medio de cultivo se procede a la presente etapa que es la de inducción. El inicio del cultivo es una fase muy delicada en la que la porción de tejido vegetal que sirve de inóculo debe sobrevivir al aislamiento del resto de la planta original y comenzar el crecimiento *in vitro* (Marin Velazquez, 1997).

Esta etapa se la realiza en cámaras de flujo laminar horizontal para dar protección de la muestra; con lo que se pretende reducir la posibilidad de contaminación exógena del explante y del medio de cultivo.

En cultivo *in vitro* las plantas no son completamente autótrofas, por lo que la composición del medio de cultivo es fundamental para su desarrollo. El medio de cultivo más común y más utilizado es Murashige y Skoog (1962), en especial si el objetivo es la regeneración de plantas (Pierik, 1990).

Luego de sembrar los explantes en los medios, se mantiene los frascos sembrados en un cuarto de incubación donde serán monitoreados permanentemente para registrar presencia/ausencia de contaminación. Si no hay contaminación se deja crecer los explantes hasta que tengan las condiciones deseadas para cambiar de medio para la diferenciación del tejido (Roca & Mroginski, 1993).

ETAPA 3: Multiplicación de brotes

Se espera que el material vegetal que sobrevivió a la etapa de desinfección y a la de establecimiento, haya originado brotes con hojas. Este tejido puede ser nuevamente fragmentado y trasladado a un nuevo medio de cultivo en el cual su desarrollo continuará con la formación de tejido desdiferenciado, callo o formación de brotes, (Cubero, 2003). Estos nuevos brotes se deben subcultivar periódicamente con la finalidad de obtener una

mayor cantidad de plántulas en cada división. El número de plantas que se obtenga dependerá de la especie, su genética, y las condiciones del medio de cultivo (Castillo, 2011).

ETAPA 4: Enraizamiento y elongación

El proceso de enraizamiento requiere generalmente del trasplante de los brotes propagados a un medio de cultivo con menor concentración de sales y un balance hormonal apropiado para la inducción de radícula. Generalmente se disminuye la concentración de citoquininas y se aumentan la concentración de auxinas exógenas para estimular la diferenciación del sistema radical (Roca & Mroginski, 1993). Al final de esta etapa deberá quedar formada completamente la vitroplanta (Rojas, García, & Alarcón, 2004).

1.4.11. Sistema de inmersión temporal

En el año 1997, surgió el denominado Sistema de Inmersión temporal, creado en el CIRAD de Francia (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique Pour le Développement), este sistema, se logró a partir de la aplicación de un flujo de aire a uno de sus frascos, el cual hacía subir el medio de cultivo y luego de bañar los explantes, el medio descendía por gravedad.

Este método ha revolucionado los métodos tradicionales de micropropagación, pues se ha logrado una mayor tasa de multiplicación, enraizamiento y aclimatación, así como niveles elevados de supervivencia en condiciones de campo, se plantea que este sistema provoca cambios en la atmósfera interna de los frascos, trayendo consigo un mayor crecimiento y desarrollo de los explantes, además de que las vitroplantas mantienen una capa superficial de medio de cultivo hasta la próxima inmersión, lo que evita la pérdida por desecación (Rosales, Rodríguez, Alvarado, & Cárdenas, 2003).

La aplicación de técnicas biotecnológicas para el mejoramiento de la agricultura se ve limitada por los altos costos de transferencia de la tecnología desde el laboratorio al campo y por la falta de información e interés de los productores agropecuarios ante la posibilidad de usar la biotecnología como una herramienta para aumentar los niveles de producción (Bermudez, 1997).

La semi-automatización de los sistemas de propagación *in vitro* de plantas es un paso fundamental para la reducción de los costos, al respecto, el cultivo en medio líquido representa una alternativa para la reducción de los costos operativos en la micropropagación de plantas (Pérez, Ponce, Jiménez, & Agramonte, 1998). Sin embargo, se han reportado efectos negativos como la hiperhidricidad o dificultades en la aclimatación de plantas

propagadas en medios de cultivos líquidos estáticos (Bhagyalakshmi & Singh, 1995). Por ello se han creado los sistemas para la inmersión temporal (SIT) de los explantes, que permiten el empleo de medios de cultivo líquido sin efectos colaterales. Sobre la base de estos principios, se han construido una serie de aparatos como los descritos por Aitken-Christie y Davis (1988), quienes reportan el aumento en número y peso de brotes.

El SIT además de solucionar las dificultades de los cultivos estáticos, despliegan la posibilidad de automatizar algunas etapas del cultivo *In vitro*, permiten mayor facilidad de escalado y aumentan los índices de multiplicación, desarrollo y productividad del material propagado (Pérez, Ponce, Jiménez, & Agramonte, 1998). El SIT pueden aplicarse en la propagación masiva de plantas élites, mediante organogénesis o embriogénesis somática, para incrementar los coeficientes de multiplicación en comparación con las formas convencionales de propagación *in vitro* (cultivo en medio sólido o líquido semi-sumergido o sumergido) (CIRAD, 2003).

1.4.11.1. Importancia del SIT ante la micropropagación

Al trabajar en medios líquidos temporales se puede mantener una gran cantidad de plántulas en un mismo volumen. El contacto intermitente del medio con los explantes reduce el nivel de toxinas presentes, ya que se

mantienen limpias de sus propios exudados que pueden ser perjudiciales para su crecimiento (Cruzat, 2009).

El mecanismo permite renovar y/o modificar la atmósfera interna de los contenedores y eventualmente, controlar ciertos aspectos de su desarrollo (preaclimatación) (Cruzat, 2009).

Estas dos características del contacto intermitente de toda la superficie de los explantes con el medio y del intercambio gaseoso de la atmósfera interna no suelen combinarse en otros procedimientos de cultivo de tejidos vegetales (Berthouly & Etienne, 2005).

Este método muestra un impacto importante en los métodos tradicionales de micropropagación, ya que se ha logrado una mayor tasa de multiplicación y aclimatación, así como mayores niveles de supervivencia en condiciones de campo (Rodrigo, 2009).

La ventilación de aire forzado contiene concentraciones de gases y humedad relativa del cuarto de cultivo, probablemente con un efecto positivo. La humedad relativa resultante de la ventilación forzada puede estimular la transpiración de las plantas, que luego será más eficiente para adaptarse a condiciones *ex vitro* (Berthouly & Etienne, 2005).

1.4.11.2. El valor de la herramienta desarrollada

El sistema de inmersión temporal en biorreactores constituye una herramienta tecnológica interesante, principalmente para el sector dedicado a la multiplicación de plantas, ya que su implementación permitiría mejorar la eficiencia del proceso de propagación *in vitro* de distintas especies, con los siguientes méritos respecto de la técnica convencional (Rodrigo, 2009): aumento importante en las tasas de multiplicación, mejoramiento en el porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de las plantas en la etapa de aclimatación; aumento en los niveles de mecanización de algunas etapas de la micropropagación, reducción en el uso de la mano de obra, reducción en los costos de reactivos e insumos por planta final, disminución del costo por planta y aumento de la rentabilidad del proceso.

1.4.11.3. Parámetros que afectan la eficiencia del Sistema de Inmersión Temporal.

Frecuencia y tiempo de inmersión

La frecuencia y el tiempo de inmersión son parámetros muy importantes a considerar, ya que regulan la absorción de nutrientes y la expresión de hiperhidratación (Berthouly & Etienne, 2005). Para evitar la hiperhidratación de varias especies, deben usarse tiempos cortos y frecuencias amplias de

inmersión, ya que el contacto continuo de los tejidos con el medio de cultivo líquido es fuente de hiperhidratación (Berthouly & Etienne, 2005).

Volumen de medio líquido

Otro factor de importancia es el volumen del medio líquido cuando se utilizan sistemas de inmersión temporal ya que a mayor volumen de medio, disminuirá el área del volumen de aire. Por eso recomiendan utilizar 50ml por explante, y que el medio de cultivo ocupe la cuarta parte del recipiente que lo contiene (De la Cruz, 2014)

1.4.11.4. Funcionamiento del SIT

Un recipiente que contiene las plántulas está conectado con otro que contiene la solución nutritiva; a su vez, cada uno se conecta con una manguera de presión de aire. El traslado del medio líquido al otro recipiente se produce mediante el aumento de la presión de aire interna, así, el medio se moviliza hacia el contenedor de menor potencial de presión. Este mecanismo se realiza en ambos contenedores, alternadamente, como se observa en la Figura 4 (Rodrigo, 2009).

El tiempo en que estén en contacto, los explantes con el medio se conocen como tiempo de inmersión, y el intervalo que existe entre los tiempos de inmersión se conoce como el tiempo de ciclo o frecuencia.

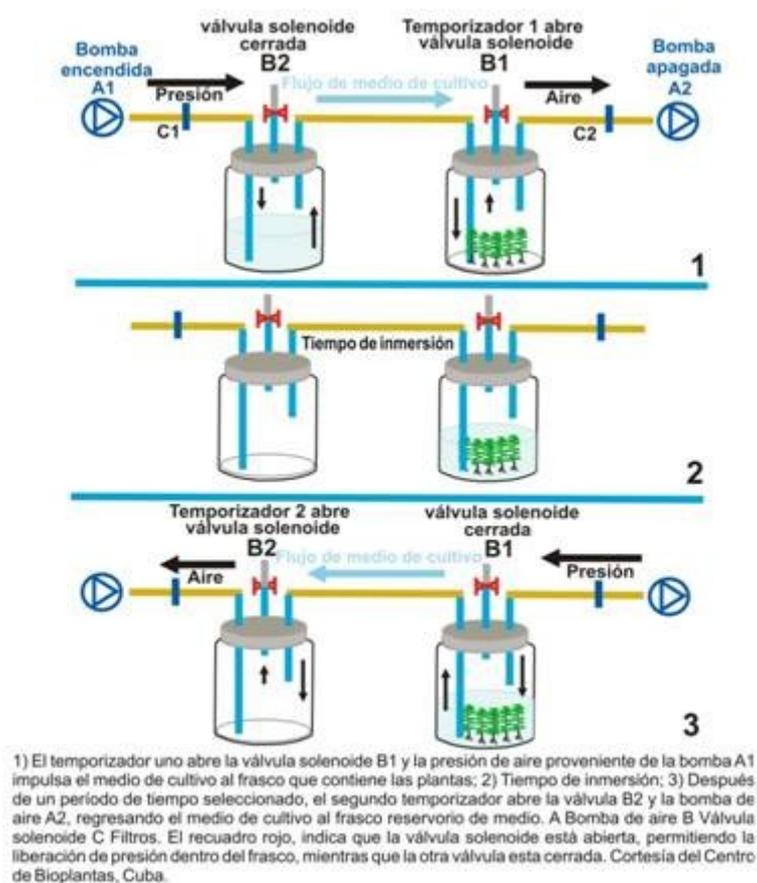


Figura 4 Sistema de inmersión temporal (SIT)

Fuente: Villapudua & Sáinz, 2005

CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA

2.1. Selección de la dosis óptima de BAP o BAP+PBZ en medio de cultivo líquido en inmersión parcial.

2.1.1. Recolección y transporte del material vegetal

Las plantas muestreadas se seleccionaron *in situ* escogiendo los explantes con las mejores características: mayor número de hojas, libres de enfermedades; además plantas con un número de yemas adecuado y condiciones fisiológicas similares (Pierik, 1990). La recolección se la realizó en el Valle de los Chillos, se cortó varetas con un diámetro de 0.9 cm \pm 0.2 y 1m de largo. Las varetas fueron empacadas en papel periódico, se roció con agua para mantener la humedad hasta trasladarlas al laboratorio.

2.1.2. ETAPA 1: Desinfección del material vegetal

Una vez en el laboratorio, el material vegetal fue lavado con detergente líquido; con un cepillo se retiró las impurezas que estaban en las varetas, posteriormente se sumergieron en una solución de Benlate 2 g, Tetraciclina (1 capsula o 5 mg), jabón líquido (100 ml), yodo (5 ml) y ácido cítrico (0.1 g), aforado a 4 litros de agua destilada durante 45 minutos.

Luego de la desinfección, se enjuagó con agua destilada tres veces por un minuto cada enjuague. Se cortó las varetas en trozos de 10 cm, dejando en el centro de cada corte de una a dos yemas.

El material vegetal fue trasladado a cámara de flujo laminar, y se los sumergió en una solución al 8% de cloro comercial durante diez minutos, se lavó con agua destilada tres veces seguidas durante diez minutos. Finalmente, los explantes fueron cortados por los extremos hasta quedar de 2 cm de longitud aproximadamente para realizar la introducción en el medio MS (1962).

2.1.3. ETAPA 2: Introducción del material in vitro

2.1.3.1. Preparación del medio de cultivo para introducción

Para la fase de introducción se utilizaron las sales de Murashigue y Skoog al 50 % de macro y micronutrientes, adicionalmente se colocó $15 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ de sucrosa, 0.5 mL BAP [$1500 \text{ mL} \times \text{L}^{-1}$] y 0.1 mL AIA [$1500 \text{ mL} \times \text{L}^{-1}$]; se reguló el pH del medio de cultivo a 5.6, luego se adicionó 4g de agar y se lo disolvió a temperatura. Se dispensó 20ml de medio en envases previamente esterilizados y luego se autoclavarón los envases a una presión de 15 PSI a 121°C durante 30 minutos.

2.1.3.2. Siembra del explante en el medio de cultivo

Luego de la desinfección, las miniestacas se sembraron en medios de cultivo de introducción estéril y trasladados al cuarto de crecimiento en el cual permanecieron por un período de quince a veinte días con luz artificial (16 horas luz y 8 horas oscuridad), temperatura promedio de 23°C. Una vez conseguido los brotes, se cortó los apicales para subcultivarlos en nuevos medios de cultivo. Con los brotes obtenidos después del tercer subcultivo, se dio inicio a la etapa de multiplicación en el sistema de inmersión parcial.

2.1.4. ETAPA 3: Multiplicación de los brotes en sistema de inmersión parcial.

2.1.4.1. Preparación del medio de cultivo líquido para multiplicación

Para la fase de multiplicación en inmersión parcial se utilizaron las sales de Murashigue y Skoog al 50 % de macro y micronutrientes, adicionalmente se colocó 30 g.L⁻¹ de sucrosa, 1.3 ml BAP [1500 mLxL⁻¹], 0.3 ml AIA [1500 mLxL⁻¹]; 0 mg.L⁻¹, 0.75 mg.L⁻¹, 1.25 mg.L⁻¹ y 1.75 mg.L⁻¹ de CULTAR para cada tratamiento (Tabla 1); se regulo el pH del medio de cultivo a 5,6. Se autoclavaron los medios a una presión de 15 PSI a 121°C durante 30

minutos. Se trasladaron los medios a cámara de flujo para dispensar 20ml en frascos previamente esterilizados.

Tabla 1 Concentración de paclobutrazol utilizado en el pretratamiento de multiplicación de mora sin espina *Rubus glaucus Benth*, en un Sistema de Inmersión Parcial.

Tratamiento	Reguladores	[CULTAR] mg.L ⁻¹
T1	BAP	0
T2	BAP+CULTAR	0.75
T3	BAP+CULTAR	1.25
T4	BAP+CULTAR	1.75

2.1.4.1. Selección y siembra de explantes en el medio de cultivo.

De la fase de introducción se seleccionó explantes que poseían características similares: longitud y grosor del tallo; sin presencia de contaminación. Los explantes seleccionados fueron trasladados a cámara de flujo lamiar y se cortaron los apicales para sembrar en los medios de cultivo de multiplicación. Posteriormente a las siembras, los cultivos fueron llevados al cuarto de crecimiento donde permanecieron por dos meses con luz artificial (16 horas luz y 8 horas oscuridad), temperatura promedio de 23°C. Una vez transcurrido el mes, se prosiguió a la toma de datos para determinar el medio de cultivo óptimo y así pasar a la siguiente fase del ensayo, además se realizó una regresión lineal polinómica para determinar la dosis de CULTAR exacta para conseguir brotes homogéneos y con longitud del brote deseado (35 mm).

2.2. Evaluación de tres tiempos de ciclo en la producción de explantes de mora sin espina *Rubus glaucus Benth*, en la fase de multiplicación en el SIT.

2.2.1. ETAPA 3: Multiplicación de los brotes en sistema de inmersión temporal.

2.2.1.1 Preparación del medio de cultivo líquido para multiplicación

Para la fase de multiplicación en el sistema de inmersión temporal (SIT) se utilizaron las sales de Murashigue y Skoog al 50 % de macro y micronutrientes, adicionalmente se colocó 30 g.L⁻¹ de sucrosa, 1.3 ml BAP [1500 mLxL⁻¹] y 0.3 ml AIA [1500 mLxL⁻¹]; se reguló el pH del medio de cultivo a 5,6. Se autoclavaron los medios a una presión de 15 PSI a 121°C durante 30 minutos. Los medios autoclavados se trasladaron a cámara de flujo para ser dispensados en los envases de los biorreactores correspondientes al medio de cultivo previamente esterilizados; se colocó 50ml por explante en cada biorreactor.

2.2.4.2. Siembra del explante en el medio de cultivo

El sistema de inmersión temporal, estuvo conformado por dos frascos de vidrio de 850 ml de capacidad, uno para el crecimiento de los explantes y el

otro como reservorio de medio de cultivo. Estos frascos se conectaron entre sí por una manguera de silicona de 6 mm de diámetro (Figura 4).

El medio de cultivo circuló de un frasco a otro en dependencia de la apertura o cierre de acuerdo al temporizador programable para determinar la frecuencia y duración de la inmersión. En la entrada de los frascos se colocó filtros hidrofóbicos (0.20 μm ,) para garantizar la esterilidad del aire. La presión del aire fue regulada por un manómetro (Figura 3).

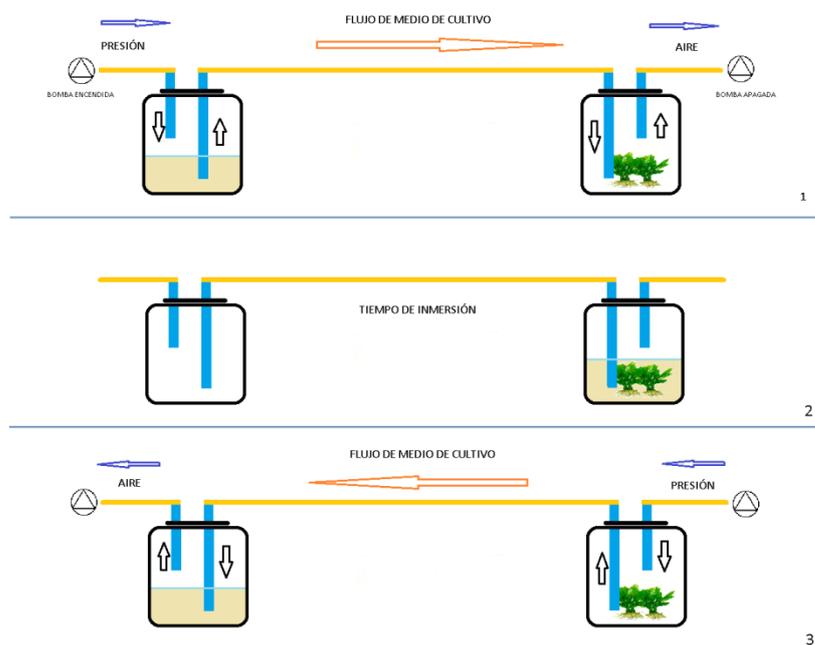


Figura 5 Sistema de inmersión temporal (SIT)



Figura 6 Biorreactores en el Sistema de Inmersión Temporal.

Se seleccionó explantes del tercer subcultivo de la fase de introducción, que poseían características similares: longitud y grosor del tallo; sin presencia de contaminación. Los explantes seleccionados fueron trasladados a cámara de flujo laminar y se cortaron los apicales para sembrar en los envases de los biorreactores correspondientes a los explantes. Después de la siembra, los cultivos fueron trasladados y permanecieron en el cuarto de crecimiento por un mes con luz artificial (16 horas luz y 8 horas oscuridad), temperatura promedio de 23°C. Una vez transcurrido el mes, se prosiguió a la toma de datos.

2.3. Programación del SIT

En esta investigación se trabajó con el tiempo de inmersión constante de dos minutos, variando solo el tiempo de ciclo y el medio de introducción de los explantes iniciales del biorreactor.

La programación del tiempo del ciclo del SIT se realizó en un programador lógico controlado (PLC) de la marca SIEMENS, en el que se programó tiempos de ciclo de 12, 15 y 18 horas. El software de programación es el LOGOSOFT.

2.4. Diseño estadístico

Los factores utilizados para el análisis estadístico en esta investigación fueron los siguientes: tiempo de ciclo y medio de introducción (Tabla 2).

Tabla 2 Factores a usar en el DCA.

A=tiempo de ciclo(horas)	B=medio de introducción
t_{12}	m_l =medio sólido
t_{15}	m_s =medio líquido
t_{18}	

Los tratamientos quedaron establecidos como se indica en la Tabla 3:

Tabla 3 Tratamientos utilizados en el arreglo factorial en un DCA.

N° tratamiento	Tratamiento	Código	Descripción
1	TR1	$t_{12}m_s$	12h medio de introducción sólido
2	TR2	$t_{15}m_s$	15h medio de introducción sólido
3	TR3	$t_{18}m_s$	18h medio de introducción sólido
4	TR4	$t_{12}m_l$	12h medio de introducción líquido
5	TR5	$t_{15}m_l$	15h medio de introducción líquido
6	TR6	$t_{18}m_l$	18h medio de introducción líquido

Como los tratamientos se ensayaron en condiciones homogéneas al igual que el material experimental, se utilizó un arreglo factorial en un diseño completamente al azar (DCA) con cuatro observaciones por tratamiento y ocho por nivel del biorreactor.

Se determinó la efectividad de los tratamientos en el ensayo mediante el análisis de las variables índice de producción que corresponde a la razón entre el número de brotes obtenidos, tras el periodo de crecimiento en el SIT, respecto a la densidad de explantes iniciales; y peso fresco que se refiere al peso de los brotes medido al final del tratamiento. También se midió la vigorosidad de los explantes mediante la observación de características como: número de brotes por explante, número de hojas por brote y longitud del brote. Se seleccionaron 105 explantes de la fase de introducción, y se asignaron 35 explantes a cada tratamiento separados y distribuidos en forma aleatoria, cinco explantes para cada unidad experimental.

2.4.1. Unidad experimental

La unidad experimental fueron los frascos, los cuales contuvieron 5 explantes de mora de castilla *Rubus glaucus Benth* como sub unidades experimentales.

2.242. Análisis

El análisis de los resultados se realizó con ayuda del programa estadístico INFOSTAT, donde se generó los análisis de varianza (ANOVA), pruebas de las medias con Duncan al 5%.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

El presente capítulo muestra los resultados obtenidos, en la inmersión parcial, determinando el medio de cultivo para trabajar en la siguiente fase de la investigación; y los datos obtenidos de la fase de multiplicación de mora en el sistema de inmersión temporal.

3.1. Selección de la dosis óptima de BAP o BAP+PBZ en medio de cultivo líquido en inmersión parcial para la multiplicación de mora sin espina *Rubus glaucus Benth.*

Se realizó la estandarización del medio de cultivo para multiplicación, mediante la aplicación de CULTAR (paclobutrazol) en cuatro diferentes concentraciones para homogenizar el crecimiento de los brotes.

Tabla 4 ANOVA de la inmersión parcial para las tres variables analizadas en el ensayo de inmersión parcial.

	Número de brotes			Longitud del Brote (mm)		Diámetro del brote (mm)	
	Gl	CM	p-valor	CM	p-valor	CM	p-valor
Mod.	3	36.94	<0.0001	8325.1	<0.0001	4.49	<0.0001
Trata.	3	36.94	<0.0001	8325.1	<0.0001	4.49	<0.0001
Error	108	0.09		2.26		0.0009.2	
CV		10.57		10.98		3.08	

Se observa diferencias significativas en las variables número de brote ($F_{3;108}=415.61$; $p<0.0001$), longitud del brote ($F_{3;108}=3679.39$; $p<0.0001$) y diámetro del brote ($F_{3;108}=4865.95$; $p<0.0001$) (Tabla 4).

Tabla 5 Prueba de Duncan. Variables analizadas en el ensayo de inmersión parcial

Tratamiento	Número de brotes			Longitud de brote (mm)			Diámetro del brote (mm)		
	Media	D.E.		Media	D.E.		Media	D.E.	
T1	3.4	± 0.05	c	33.7	± 0.24	d	1.05	± 0.0048	B
T2	3.3	± 0.06	b	3.9	± 0.26	c	1.10	± 0.01	C
T3	3.3	± 0.05	b	2.2	± 0.29	b	1.20	± 0.01	D
T4	0	± 0.09	a	0	± 0.43	a	0	± 0.01	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0.05$)

En la variable número de brotes, el T1 (1.3 mg.L⁻¹ BAP) presentó un mayor número de brotes (3.4 brotes por explante), seguido por T2 (1.3 mg.L⁻¹ BAP; 0.75 mg.L⁻¹ CULTAR), T3 (1.3 mg.L⁻¹ BAP; 1.25 mg.L⁻¹ CULTAR) (3.3 brotes por explante) y T4 (1.3 mg.L⁻¹ BAP; 1.75 mg.L⁻¹ CULTAR) (inhibición del desarrollo de los brotes) (Tabla 5).

En cuanto a la variable longitud del brote, T1 (1.3 mg.L⁻¹ BAP) presentó una mayor longitud de los brotes (33.7 mm), seguido de T2 (1.3 mg.L⁻¹ BAP; 0.75 mg.L⁻¹ CULTAR) (3.9 mm), T3 (1.3 mg.L⁻¹ BAP; 1.25 mg.L⁻¹ CULTAR) (2.2 mm) y T4 (1.3 mg.L⁻¹ BAP; 1.75 mg.L⁻¹ CULTAR) (inhibición del desarrollo de los brotes) (Tabla 5).

Para la variable diámetro del brote, tenemos que el T3 (1.3 mg.L⁻¹ BAP; 1.25 mg.L⁻¹ CULTAR) presenta el valor de la media de diámetro de brote

más alto (1.2 ± 0.01 mm), seguido de T2 (1.3 mg.L⁻¹ BAP; 0.75 mg.L⁻¹ CULTAR) (1.1 ± 0.01 mm), T1 (1.3 mg.L⁻¹, BAP) (1.05 ± 0.0048 mm) y T4 (1.3 mg.L⁻¹ BAP; 1.75 mg.L⁻¹ CULTAR) (inhibición del desarrollo de los brotes) (Tabla 5).

Se consideró el tratamiento T1 (1.3 mg.L⁻¹, BAP) como el más apto para continuar con la fase de multiplicación de mora en el Sistema de Inmersión Temporal.

Usando los datos de la longitud del brote en función de la concentración de CULTAR, se realizó una regresión lineal polinómica en el programa Excel, en el que se graficó (Figura 7) y se calculó la ecuación del mismo, tomando como referencia 35 mm como longitud ideal para trabajar en multiplicación de mora en el SIT. Como resultado se obtuvo la siguiente ecuación: $y = 0.006x^2 - 0.253x + 1,786$, con una $R^2 = 0.973$. Donde x es la longitud del brote que se espera conseguir (35 mm) y y es la concentración de CULTAR que se desea encontrar.

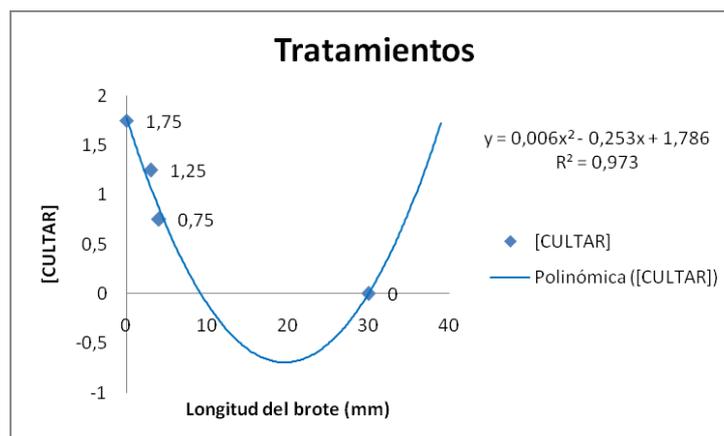


Figura 7 Regresión lineal polinómica de la concentración de CULTAR.

De esta manera se determino que la concentración de CULTAR ideal es de $y=0.281 \text{ mg.L}^{-1}$. Con esta concentración, teóricamente se podrá obtener brotes homogéneos y con la longitud del brote esperado.

3.2. Evaluación de tres tiempos de ciclo de inmersión temporal y de la producción, para los explantes de mora sin espina *Rubus glaucus* Benth, en la fase de multiplicación del SIT.

Tabla 6 Análisis de varianza de las variables peso fresco, longitud del brote, número de hojas por brote y índice de producción.

	gl	Peso fresco (g)		Long. del Brote (mm)		Núm. de hojas por brote		Índ. de producción	
		CM	p-valor	CM	p-valor	CM	p-valor	CM	p-valor
Mode	5	1.65	<0.0001	147	<0.0001	97.52	<0.0001	2.00	<0.0001
T	2	3.33	<0.0001	298	<0.0001	169.4	<0.0001	3.12	<0.0001
M	1	0.89	<0.0001	115	<0.0001	140.95	<0.0001	0.36	<0.1515
Inter.	2	0.26	<0.0003	11,5	<0.0001	23.21	<0.0001	1.22	<0.0049
Error	gl: 99, CM: 0.03			gl: 301, CM: 0.11		gl: 301, CM: 2.16		gl: 15, CM: 0.16	
CV		32.69		25.28		39.48		26.89	

t: tiempo de ciclo; *m*: medio de cultivo

El peso fresco presenta diferencias significativas para el tiempo de ciclo del biorreactor ($F_{2;99}=113.27$; $p<0.0001$), para el medio de cultivo de introducción ($F_{1;99}=30.39$; $p<0.0001$) y para la interacción entre el tiempo de ciclo con el medio de cultivo de introducción ($F_{2;99}=8.98$; $p<0.0001$) (Tabla 6).

La longitud del brote presenta diferencias significativas para el tiempo de ciclo del biorreactor ($F_{2;301}=273.16$; $p<0.0001$), para el medio de cultivo de introducción ($F_{1;301}=105.11$; $p<0.0001$) y para la interacción entre el tiempo de ciclo con el medio de cultivo de introducción ($F_{2;301}=10.59$; $p<0.0001$) (Tabla 6).

El número de hojas por brote presenta diferencias significativas para el tiempo de ciclo del biorreactor ($F_{2;301}=78.28$; $p<0.0001$), para el medio de cultivo de introducción ($F_{1;301}=65.13$; $p<0.0001$) y para la interacción entre el tiempo de ciclo con el medio de cultivo de introducción ($F_{2;301}=10.72$; $p<0.0001$) (Tabla 6).

El índice de producción presenta diferencias significativas para el tiempo de ciclo del biorreactor ($F_{2;301}=19.76$; $p<0.0001$) y para la interacción entre el tiempo de ciclo con el medio de cultivo de introducción ($F_{2;301}=7.74$; $p<0.0049$) (Tabla 6).

Tabla 7 Prueba de Duncan. Medias (Tiempo de ciclo del biorreactor) de las variables índice de producción, peso fresco, longitud del brote y número de hojas por brote.

Tiempo ciclo	Peso fresco (g)		Longitud del Brote (mm)		Número de hojas por brote		Índice de producción	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
12h	0.87	±0.03 c	1.69	±0.03 c	4.70	±0.11 c	2.16	±0.15 c
15h	0.50	±0.03 b	1.07	±0.04 b	2.96	±0.17 b	1.51	±0.15 b
18h	0.25	±0.03 a	0.51	±0.05 a	2.02	±0.21 a	0.81	±0.15 a

El valor de la media más alto para el peso fresco fue en el t_{12} horas ($0.87 \pm 0.03g$), seguido del t_{15} horas ($0.50 \pm 0.03g$) y el t_{18} horas ($0.25 \pm 0.03g$); para la longitud del brote fue en el t_{12} horas (16.9 ± 0.3 mm), seguido del t_{15} horas (10.7 ± 0.4 mm) y el t_{18} horas (5.1 ± 0.5 mm); número de hojas por brote fue el t_{12} horas (4.70 ± 0.11), seguido del t_{15} horas (2.96 ± 0.17) y el t_{18} horas (2.02 ± 0.21); y para el índice de producción fue el t_{12} horas (2.16 ± 0.15), seguido del t_{15} horas (1.51 ± 0.15) y el t_{18} horas (0.81 ± 0.15). (Tabla 7).

En la figura 5 muestra brotes obtenidos según el tiempo de ciclo.



Figura 8 Brotes obtenidos en cada uno los tiempos de ciclo propuestos en esta investigación (Tiempos de ciclo: 12 horas, 15 horas y 18 horas).

Tabla 8 Prueba de Duncan. Medias (Medio de cultivo de introducción) de las variables índice de producción, peso fresco, longitud del brote y número de hojas por brote.

Medio de cultivo proveniencia	Peso fresco (g)		Longitud del brote (mm)		Número de hojas por brote		Índice de producción					
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.				
m_s	0.63	±0.03	b	1.32	±0.03	b	4.03	±0.14	b	1.63	±0.11	B
m_l	0.44	±0.02	a	0.86	±0.03	a	2.42	±0.14	a	1.36	±0.13	A

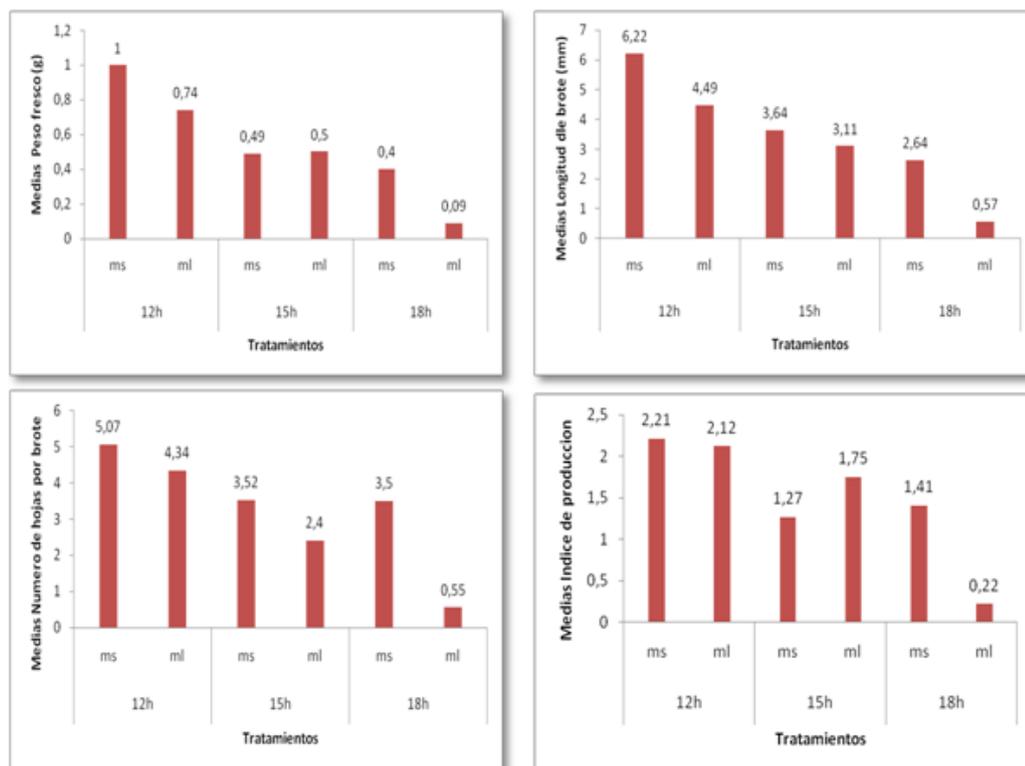
El valor de la media más alto para el peso fresco fue en el m_s (0.63g±0.03) seguido de m_l (0.44g±0.44); para longitud de brote fue el m_s (13.2 mm±0.03) seguido de m_l (8.6 mm±0.03); para el número de hojas fue el m_s (4.03±0.14) seguido de m_l (2.43±0.14); y para el índice de producción fue el m_s (1.63±0.11) seguido de m_l (1.36±0.13). (Tabla 8).

Tabla 9 Prueba de Duncan. Medias (Interacción Tiempo de ciclo-medio de introducción) de las variables índice de producción, peso fresco, longitud del brote y número de hojas por brote.

Tiempo de ciclo	Trat.	Med cult proveniencia	Peso fresco (g)		Longitud del Brote (mm)		Número de hojas por brote		Índice de producción					
			Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.				
12h	TR1	m _s	1	±0.04	d	6,22	±0,12	f	5.07	±0.17	e	2.21	±0.23	c
	TR2	m _l	0.74	±0.04	c	4,49	±0,11	e	4.34	±0.15	d	2.12	±0.20	c
15h	TR3	m _s	0.49	±0.04	b	3,64	±0,21	d	3.52	±0.29	c	1.27	±0.23	b
	TR4	m _l	0.50	±0.04	b	3,11	±0,13	c	2.40	±0.19	b	1.75	±0.20	bc
18h	TR5	m _s	0.40	±0.04	b	2,64	±0,19	b	3.50	±0.27	c	1.41	±0.23	b
	TR6	m _l	0.09	±0.04	a	0,57	±0,23	a	0.55	±0.33	a	0.22	±0.20	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0.05$);
m_s= medio sólido y m_l= medio líquido.

Gráfico 1 Medias (Interacción Tiempo de ciclo-medio de introducción) de las variables peso fresco, longitud del brote, número de hojas por brote y índice de producción.



El valor de la media más alto para el peso fresco fue en el TR1 (12 horas, medio sólido) (1 ± 0.04 g), seguido de TR2 (12 horas, medio líquido) (0.74 ± 0.04 g), TR3 (15 horas, medio sólido) (0.49 ± 0.04 g), TR4 (15 horas, medio líquido) (0.5 ± 0.04 g), TR5 (18 horas, medio sólido) (0.4 ± 0.04 g) y TR6 (18 horas, medio líquido) (0.09 ± 0.04 g).

El valor de la media más alta para longitud del brote se obtuvo en TR1 (12 horas, medio sólido) (6.22 ± 0.12 mm), seguido del TR2 (12 horas, medio líquido) (4.49 ± 0.11 mm), TR3 (15 horas, medio sólido) (3.54 ± 0.21 mm),

TR4 (15 horas, medio líquido) (3.11 ± 0.13 mm), TR5 (18 horas, medio sólido) (2.54 ± 0.19 mm) y TR6 (18 horas, medio líquido) (0.57 ± 0.23 mm).

El valor de la media más alto de número de hojas por brote fue el de TR1 (12 horas, medio sólido) (5.07 ± 0.17 cm), seguido por TR2 (12 horas, medio líquido) (4.34 ± 0.15), TR3 (15 horas, medio sólido) (3.52 ± 0.29), TR4 (15 horas, medio líquido) (2.40 ± 0.19), TR5 (18 horas, medio sólido) (3.50 ± 0.27) y TR6 (18 horas, medio líquido) (0.55 ± 0.33).

El valor de la media más alto de índice de producción corresponde al TR1 (12 horas, medio sólido) (2.21 ± 0.23), seguido del TR2 (12 horas, medio líquido) (2.12 ± 0.20), TR3 (15 horas, medio sólido) (1.27 ± 0.23), TR4 (15 horas, medio líquido) (1.75 ± 0.20), TR5 (18 horas, medio sólido) (1.41 ± 0.23) y TR6 (18 horas, medio líquido) (0.22 ± 0.20) (Tabla 9, Gráfico 1).

3.3. Análisis de costos

Fue necesario realizar un análisis de costo de producción tomando en cuenta recursos económicos con la finalidad de contrastar la propagación de plántulas mediante el método convencional y la propagación empleando el SIT utilizando los datos obtenidos en la presente investigación. Para ello, se

consideró dentro del rubro de costos por litro de medio (Costo USDxL⁻¹) a todos los componentes del medio de Murashige & Skoog más vitaminas y reguladores de crecimiento, que para el caso del SIT, equipo, herramientas, materiales, servicios básicos y recurso humano que se utilizaron en el desarrollo de la presente investigación.

A continuación se detalla todos los gastos realizados por actividades: preparación de medio de cultivo y siembra de los explantes en el biorreactor (Tabla 10)(Tabla 12)(Tabla 13). De igual manera se detalló los gastos realizados en la multiplicación convencional para poder comparar con la multiplicación en el SIT (Tabla 11).

Tabla 10 Costos de equipos, herramientas, materiales e insumos (reactivos para 1.05 L de medio de cultivo) empleados en la fase de multiplicación de mora sin espina *Rubus glaucus Benth* en el SIT.

Gasto por actividad	Materiales						
	Equipos	Cantidad	Costos	%DEP	DA	DM	
Preparacion de medios	Autoclave	1	2.916,00	20%	583,20	48,60	
	Destilador 20L	1	1.902,00	20%	380,40	31,70	
	Balanza Analítica	1	965,00	20%	193,00	16,08	
	Microondas	1	147,25	20%	29,45	2,45	
	Refrigerador	1	562,86	20%	112,57	9,38	
	Agitador magnetico	1	390,00	20%	78,00	6,50	
	pH metro	1	283,00	20%	56,60	4,72	
	Total		7.166,11	20%	1.433,22	119,44	
	Herramientas	Cantidad	Costos	%DEP	DA	DM	
	Jarra plástica	1	2,50	25%	0,63	0,05	
	Botellas tapa azul 1000ml	2	11,00	25%	2,75	0,23	
	Tina	1	5,00	25%	1,25	0,10	
	Probeta 100ml	1	8,00	25%	2,00	0,17	
	Probeta 50ml	1	3,99	25%	1,00	0,08	
	Frascos de vidrio con tapa plastica	14	84,00	25%	21,00	1,75	
	Filtros de aire 0,2um	14	182,00	25%	45,50	3,79	
	Manguera de silicon	2m	7,50	25%	1,88	0,16	
	Total		303,99	25%	76,00	6,33	
	Materiales	Cantidad	Costos	%DEP	DA	DM	
	Rollo de papel toalla	1	2,25	n/a	27,00	2,25	
	Marcador permanente	1	0,35	n/a	4,20	0,35	
	Rollo de fundas plásticas	1	3,00	n/a	36,00	3,00	
	Total		5,60	n/a	67,20	5,60	
	Insumos	Cantidad	Costos	%CONSUMO	CA	CM	
	Reactivos	1 frasco/reactivo	924,46	0,12%	1,11	0,09	
	Total		924,46	0,12%	1,11	0,09	
	Siembra	Equipos	Cantidad	Costo	% DEP	DA	DM
		Cámara de Flujo	2	2.700,00	20%	540,00	45,00
		Total		2.700,00	20%	540,00	45,00
		Herramientas	Cantidad	Costo	% DEP	DA	DM
		Mechero de Bunsen	1	30,00	25%	7,50	0,63
		Mechero de alcohol	1	18,00	25%	4,50	0,38
		Pinza metálica grande	1	3,00	25%	0,75	0,06
Pinza metálica mediana		1	3,00	25%	0,75	0,06	
Pinza metálica pequeña		1	3,00	25%	0,75	0,06	
Tijeras metálicas		1	3,00	25%	0,75	0,06	
Total			60,00	25%	15,00	1,25	
Materiales		Cantidad	Costo	%DEP	DA	DM	
Fosforera		1	0,15	n/a	1,80	0,15	
Galón de Cloro al 5%		1	5,00	n/a	60,00	5,00	
Alcohol potable		1	7,00	n/a	84,00	7,00	
Gas	1	2,00	n/a	24,00	2,00		
Foco Ahorrador F14t5bf/14w	1	54,00	n/a	648,00	54,00		
Total		68,15	n/a	817,80	68,15		
Biorreactor	Mueble	Cantidad	Costo	%DEP	DA	DM	
	Estanteria	1	30,00	20%	6,00	0,50	
	Total		30,00	20%	6,00	0,50	
	Equipos	Cantidad	Costo	%DEP	DA	DM	
	Compresor	1	170,00	20%	34,00	2,83	
Total		170,00	20%	34,00	2,83		
TOTAL		11.428,31		2.990,33	249,19		

Tabla 11 Costos de los equipos, herramientas, materiales e insumos (reactivos para 1.05 L de medio de cultivo) que se emplean en la fase de multiplicación de mora sin espina *Rubus glaucus Benth* de forma convencional.

Gasto por actividad	Materiales					
	Equipos	Cantidad	Costos	%DEP	DA	DM
Preparacion de medios	Autoclave	1	2.916,00	20%	583,20	48,60
	Destilador 20L	1	1.902,00	20%	380,40	31,70
	Balanza Analítica	1	965,00	20%	193,00	16,08
	Microondas	1	147,25	20%	29,45	2,45
	Refrigerador	1	562,86	20%	112,57	9,38
	Agitador magnetico	1	390,00	20%	78,00	6,50
	pH metro	1	283,00	20%	56,60	4,72
	Total		7.166,11	20%	1.433,22	119,44
	Herramientas	Cantidad	Costos	%DEP	DA	DM
	Jarra plástica	1	2,50	25%	0,63	0,05
	Botellas tapa azul 1000ml	2	11,00	25%	2,75	0,23
	Tina	1	5,00	25%	1,25	0,10
	Probeta 100ml	1	8,00	25%	2,00	0,17
	Probeta 50ml	1	3,99	25%	1,00	0,08
	Frascos de vidrio con tapa plastica	14	84,00	25%	21,00	1,75
	Filtros de aire 0,2um	14	182,00	25%	45,50	3,79
	Manguera de silicon	2m	7,50	25%	1,88	0,16
	Total		303,99	25%	76,00	6,33
	Materiales	Cantidad	Costos	%DEP	DA	DM
	Rollo de papel toalla	1	2,25	n/a	27,00	2,25
	Marcador permanente	1	0,35	n/a	4,20	0,35
	Rollo de fundas plásticas	1	3,00	n/a	36,00	3,00
	Total		5,60	n/a	67,20	5,60
	Insumos	Cantidad	Costos	%CONSUMO	CA	CM
	Reactivos	1 frasco/reactivo	924,46	0,12%	1,11	0,09
	Total		924,46	0,12%	1,11	0,09
	Siembra	Equipos	Cantidad	Costo	% DEP	DA
Cámara de Flujo		2	2.700,00	20%	540,00	45,00
Total			2.700,00	20%	540,00	45,00
Herramientas		Cantidad	Costo	% DEP	DA	DM
Mechero de Bunsen		1	30,00	25%	7,50	0,63
Mechero de alcohol		1	18,00	25%	4,50	0,38
Pinza metálica grande		1	3,00	25%	0,75	0,06
Pinza metálica mediana		1	3,00	25%	0,75	0,06
Pinza metálica pequeña		1	3,00	25%	0,75	0,06
Tijeras metálicas		1	3,00	25%	0,75	0,06
Total			60,00	25%	15,00	1,25
Materiales		Cantidad	Costo	%DEP	DA	DM
Fosforera		1	0,15	n/a	1,80	0,15
Galón de Cloro al 5%		1	5,00	n/a	60,00	5,00
Alcohol potable		1	7,00	n/a	84,00	7,00
Gas		1	2,00	n/a	24,00	2,00
Foco Ahorrador F14t5bf/14w		1	54,00	n/a	648,00	54,00
Total		68,15	n/a	817,80	68,15	

Tabla 12 Costo de recursos básicos por mes.

Servicios Basicos	USD/mes
Electricidad	33,07
Agua	5,00

Tabla 13 Salario por recurso humano.

RRHH	USD/mes
1,00	800,00

Como se observa en las Tablas 10 y 11, en los costos del SIT constan gastos del biorreactor mientras que para la multiplicación convencional no. El gasto de servicios básicos es el mismo al igual que los recursos humanos para los dos métodos de multiplicación (Tabla 12, Tabla 13).

Tabla 14 Análisis de comparativo de gastos entre la multiplicación de mora en el SIT y de forma convencional.

	Multiplicacion en el SIT	Multiplicacion convencional
GASTO OPERACIONAL ANUAL (USD)	13.047,15	13.007,15
GASTO OPERACIONAL POR MES (COSTO /# PLANTAS) (USD)	1.087,26	1.083,93
#PLANTAS AL MES	170,00	35,00
GASTO REAL POR PLANTA AL MES (USD)	6,40	30,97
SUSTENTABILIDAD DEL PROYECTO (%)	0,1%	0,00
SUSTENTABILIDAD DEL PROYECTO ANUAL	13,05	13,01
SUSTENTABILIDAD DEL PROYECTO MENSUAL	1,09	1,08
P.V.P 1 PLANTA (USD)	7,48	32,05
P.V.P # PLANTAS (USD)	1.272,10	1.121,87
RENTABILIDAD (USD)	184,83	37,94
# MESES DEL RETORNO	62,00	296,00

En la tabla 14 se observa el análisis comparativo de gastos entre la multiplicación de mora en el SIT y de la forma convencional, donde se observa que la multiplicación en el SIT presenta menor costo y más utilidad que la multiplicación convencional. En el SIT se obtuvo una producción de 170 plantas en un mes con un P.V.P. por planta de 7.48 USD y un retorno de 62 meses, mientras que multiplicando de forma convencional se obtiene una

producción de 35 plantas en un mes con un P.V.P. por planta de 32.05 USD y un retorno de 296 meses. De esta manera se afirma que la razón de producción de mora *Rubus glaucus Benth* es de 5 a 1 entre la multiplicación en el SIT y de forma convencional respectivamente.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1. Selección de la dosis óptima de BAP o BAP+PBZ en medio de cultivo líquido en inmersión parcial para la multiplicación de mora sin espina *Rubus glaucus Benth.*

El T1 (BAP: 1.3 mg.L⁻¹) se consideró como el mejor medio de multiplicación para ser usado en el SIT con una media de 3.4 de número de brotes, longitud de brotes de 33.7 mm y diámetro de tallo de 10.5 mm, a diferencia de T2 y T3 que presentaron valores de media de 3.3 para el número de brotes, 0.01 mm para el diámetro del brote y de 3.9 y 2.2 cm respectivamente.

El medio de T1 que contenía BAP sin CULTAR, resultó ser más eficiente para el número de brotes y su crecimiento, debido a que el 6-bencilaminopurina (BAP), se encuentra entre las citoquininas más activas, Khosravi *et al.* (2007), citado por (Bayanati & Mortazavi, 2013).

Se obtuvo resultados positivos en los tratamientos T2 (BAP: 1.3 mg.L⁻¹; CULTAR: 0.75 mg.L⁻¹) y T3 (BAP: 1.3 mg.L⁻¹; CULTAR: 1.25 mg.L⁻¹), los cuales presentaron brotes homogéneos, pero disminución del número y de la longitud de los mismos; además, engrosamiento del diámetro de los tallos, y

estos resultados son similares a los que describe Rodríguez, Aranguren, & Farrés (2005) en su investigación en la que trabaja con concentraciones de CULTAR de 0.125 mg.L^{-1} . Este resultado también fue similar a lo encontrado por Avilán, Soto, Escalante, Rodríguez, & Ruíz, (2003), quienes señalaron el efecto del paclobutrazol en el acortamiento del tamaño de los brotes.

Rodríguez et al. (2005) evaluaron el efecto del paclobutrazol sobre la formación de brotes axilares y se observó una mayor uniformidad en la brotación con la aplicación de este inhibidor del crecimiento (1.0 mg.l^{-1} de PBZ) al igual que paso en esta investigación con la mora de castilla.

Cabe resaltar que el uso del paclobutrazol posibilitó la reducción del tamaño y mayor número de brotes por frasco sin la aparición de multiyemas ni de hiperhidricidad (Milagros, et al., 2005), debido a que el paclobutrazol está directamente relacionado con la inhibición de la biosíntesis de giberelinas y como consecuencia la disminución del crecimiento vegetativo como afirman Rodríguez, Aranguren, & Farrés, (2005).

Daquinta et al. (2001) mencionado por Milagros, *et al.*, (2005), utilizaron una concentración de 2.0 mg.L^{-1} de paclobutrazol combinado con el 6-BAP (4.0 mg.L^{-1}) donde obtuvieron un coeficiente de multiplicación (7.30) en brotes del banano 'FHIA-18' (AAAB); y si comparamos con los resultados

obtenidos se observa que la concentración de CULTAR varía con la especie, y que en unas especies la concentración ideal para un buen desarrollo puede ser perjudicial para otra especie como en este caso, en el banano usan 2 mg.L^{-1} mientras que para la mora la concentración de 1.75 mg.L^{-1} fue una concentración alta lo que provocó la formación de agregados de brotes pequeños muy compactos con poco desarrollo de las hojas.

En el T4 (BAP: 1.3 mg.L^{-1} ; CULTAR: 1.75 mg.L^{-1}), no se distingue el número de brotes ya que el CULTAR causó mayor efecto por la alta concentración, lo que provocó disminución y retardo del crecimiento de los brotes.

4.2. Evaluación de tres tiempos de ciclo de inmersión temporal y de la producción, para los explantes de mora sin espina *Rubus glaucus Benth*, en la fase de multiplicación del SIT.

Para obtener una buena producción de mora se consideró varios factores como la composición del medio de cultivo de multiplicación, y el diseño de los biorreactores (material vegetal, atmósfera interna, volumen de medio por explante, tiempo de ciclo) mencionados ya en el capítulo 2, para ayudar a lo proliferación de brotes.

En la presente investigación se trabajó con tiempos de ciclo de 12, 15 y 18 horas, y a medida que aumentaba el tiempo de ciclo disminuía el índice de producción, y según varios autores como por ejemplo Cabrera, et al., (2004), afirman que a medida que aumenta el tiempo de ciclo, se incrementa la longitud del tallo, el número de brotes y por ende incrementa el índice de multiplicación.

Según Cabrera, et al., (2004), se ha probado un tiempo máximo de ciclo de hasta 6 horas, obteniendo resultados positivos con incremento de índice de producción; para el caso de anturio, también se probó un máximo de tiempo de ciclo de 6 horas dando un alto índice de multiplicación (Bautista, et al., 2004); en piña, el tiempo de ciclo con mejores resultados fue de 3 horas (Escalona, 1999); y en caña el tiempo de ciclo máximo fue de 9 horas. El tiempo máximo de ciclo varía al igual que la especie (De la Cruz, 2014).

Contrario a lo mencionado en la literatura ocurrió en este estudio, ya que al aumentar el tiempo de ciclo de 12 a 18 horas para la multiplicación de mora no presentó respuesta el índice de producción ni las demás variables establecidas, debido a que el aumento del tiempo puede producir un efecto contrario al no proporcionar suficientes nutrientes a los explantes, ocasionándoles resequecedad y muerte por fenolización (Castro & Gonzales, 2002).

Luego del análisis variable por variable, se obtuvo diferentes resultados en cada uno de los tres niveles propuestos. Es así que para el primer nivel que corresponde a los biorreactores que estuvieron sometidos a las 12 horas de tiempo de ciclo, se exhibe el índice de producción más alto que fue de 8 y el valor más bajo fue de 3.2.

De esta manera se pudo determinar que el índice de producción más alto en este trabajo se obtuvo en T1, que corresponde a 12 horas de ciclo con 2 minutos de inmersión y sus explantes provinieron de medio de cultivo de introducción sólido; en el segundo nivel que corresponde a las 15 horas de tiempo de ciclo, se encuentra como índice de producción más alto 4.4, mientras que el valor más bajo es de 1; y para el tercer nivel que corresponde a las 18 horas de tiempo de ciclo, se observa que el valor máximo es de 2.4 y el más bajo de 0.8.

El peso fresco presenta dependencia para las variables tiempo de ciclo y medio de cultivo de introducción, considerando que a tiempo de ciclo de 12 horas y explantes provenientes del medio de cultivo de introducción sólido, producen mayor peso fresco que el resto de tratamientos.

Con respecto al número de hojas por brote, se tiene dependencia de esta variable para el tiempo de ciclo y para el medio de cultivo de

introducción. De igual manera, el mejor tratamiento fue el de tiempo de ciclo de 12 horas y de los explantes que provinieron del medio de cultivo de introducción sólido.

Con respecto a los resultados de la variable longitud del brote, existe dependencia para el tiempo de ciclo y el medio de cultivo de introducción. Se observó en los análisis estadísticos que los explantes provenientes de medio de cultivo sólido de introducción y puestos en los biorreactores con tiempo de ciclo de 12 horas, tienen mejores resultados en cuanto a la producción de brotes con la longitud esperada. El valor máximo de longitud obtenido fue de 7 centímetros, que es un valor con el que se trabaja en la empresa para adaptación de la mora en el invernadero.

Según Castro & Gonzales (2002), para lograr un desarrollo en cultivo in vitro de tejidos, es necesario proveer a las plantas con suficientes nutrientes esenciales, de tal manera que no sean un factor limitante para la multiplicación en el desarrollo de las plantas. Por esta razón, los tratamientos T5 (18 horas, medio líquido) y T6 (18 horas, medio sólido) no reportaron multiplicación; Según Escaletes y Dosba, (1993) mencionado por Paucar, (2011) en su estudio, dice que la fenolización se caracteriza por un cambio en la coloración del tejido de verde a café, y esto ocurre por no tener una buena disposición de bioreguladores; al igual como ocurrió en el presente trabajo, donde los explantes cambiaron de coloración de verde a

café por la fenolización y además por la deshidratación que sufrieron al ser los tiempos de ciclo muy prolongados.

Estos resultados también se fundamentan según Debergh y Maene (1981), Robert y Smith (1990) y Preil y Hempfling (2002) mencionados por Bautista, et al., (2004), quienes afirman que los explantes que se encuentran en medio de cultivo líquido, la superficie del explante entra en contacto directo con el medio lo que permite la captación más eficaz de nutrientes y liberar los metabolitos tóxicos que pudieran acumularse en el área del tejido que se dispersan más rápido en el medio de cultivo líquido que en el sólido.

Los resultados mostraron que hubo diferencias significativas entre tratamientos con el mismo tiempo de ciclo pero con los explantes iniciales provenientes de diferentes medios de cultivo de introducción. Es así que, T1, T3 y T5, a pesar de estar con T2, T4 y T6 respectivamente en el mismo tiempo de ciclo, tuvieron mayor índice de producción (mayor longitud del tallo, mayor número de hojas, mayor peso fresco) por provenir sus explantes iniciales de medio de cultivo de introducción sólido.

Esta diferencia puede atribuirse a una mayor absorción de los reguladores de crecimiento en el cambio de medio de cultivo de sólido a líquido (Jambhale, 2000). Varias investigaciones han demostrado que en el

medio de cultivo líquido, la disponibilidad del agua, los minerales, y los reguladores de crecimiento, es mayor al compararlo con los medios de cultivo semisólido y sólido, lo que promueve un crecimiento más acelerado (Debergh, Harbaoui, & Lemeur, 1981).

Además, se tuvo la particularidad de que los explantes de forma aleatoria, sin importar el tratamiento tuvieron la formación de brotes de dos formas: en algunos explantes se formaron los brotes desde un punto de origen, mientras que en otros, los brotes salieron a lo largo del explante, esto se puede atribuir a una falta de distribución de luz o la disposición en la que se encuentren los explantes en el interior del biorreactor por la agitación que produce el medio cuando están en el tiempo de inmersión, ya que la dirección en la que crezcan los brotes de los explantes están condicionados por la producción de auxina, y esta tiende a acumularse en la parte de la planta que tiene sombra; por lo tanto si la planta no tiene sombra, la auxina bajará de la parte apical del explante a la base, promoviendo la formación de brotes de un mismo punto, caso contrario, saldrán a lo largo del explante (Squeo & Cardemil, 2006).

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

Para la multiplicación de mora en el SIT, el T1 (1.3 mg.L⁻¹ BAP, 0 mg.L⁻¹ CULTAR) dio mayor número de brotes (4 brotes por explante) y con mayor longitud (35mm) que T2 (3 brotes por explante; longitud del brote 30mm), T3 (3 brotes por explante; longitud del brote 20mm) y T4. El paclobutrazol, a concentraciones de 0.75 mg.L⁻¹ (T2) y 1.25 mg.L⁻¹ (T3), homogeniza la longitud de los brotes de mora sin espina *Rubus glaucus Benth* sin inhibir su crecimiento y desarrollo por completo pero disminuye el número de brotes y su longitud.

El tratamiento que presentó mayor producción de mora sin espina *Rubus glaucus Benth* en el SIT son los biorreactores que trabajan con 12 horas de tiempo de ciclo y que sus explantes provienen de medio de introducción sólido.

Con la utilización del SIT se incrementa la producción de mora *Rubus glaucus Benth* en razón de 5:1 (Multiplicación SIT: P.V.P.=7.48; Multiplicación convencional: P.V.P.=32.05) con relación al método convencional lo que disminuye el costo de producción y aumenta las ganancias.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

La aplicación de CULTAR a 0.75 mg.L^{-1} homogenizó los brotes obtenidos en este ensayo, pero se recomienda investigar concentraciones inferiores de paclobutrazol para la obtención de brotes homogéneos de mora sin espina *Rubus glaucus* Benth sin inhibir su desarrollo por completo.

Se recomienda aplicar tiempo de ciclo de 12 horas con explantes provenientes de medio de cultivo sólido de la fase de introducción para la multiplicación de mora sin espina *Rubus glaucus* Benth en el Sistema de Inmersión Temporal.

Se recomienda la multiplicación de mora sin espina *Rubus glaucus* Benth en el Sistema de Inmersión Temporal para obtener un índice de multiplicación superior al que se obtiene de forma convencional, y de esta manera reducir costos y optimizar el tiempo de producción.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- ABT, A. E. (18 de 02 de 2010). Produccion de mora se incrementa. *Diario el Hoy*.
- Aharoni, M. (2002). Aspects of commercial plant tissue culture propagation in liquid media. *1 st International Symposium "Liquid Systems for in Vitro Mass Propagation of Plants"*, 70-71.
- Albany, N., Jiménez, E., Vilchez, J., García, L., Feria, M., Perez, N., . . . Clavelo, J. (2005). Use of growth retardants for banana (MusaAAA cv. Grand Naine) shoot multiplication in temporary immersion systems. *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*, 213-224.
- Alcaraz, T., Ruvalcaba, L., Villegas, B., & Tafoya, F. (2008). Produccion de plantas de tomate y chile aplicando Paclobutrazol al follaje. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*, 21-28.
- Arbeláez, L. (2008). *Micropropagación de Rubus glaucus Benth sin espinas en medio sólido y por inmersión temporal*. Recuperado el 2013, de <http://www.utp.edu.co/investigacion/proyectos/detalleProyectoHTML.php?cod=740>
- Avilán, L., Soto, E., Escalante, H., Rodríguez, M., & Ruíz, J. (2003). Manejo de altas densidades de población en mango. *Revista Digital del Centro Nacional de Investigación Agropecuarias de Venezuela*.
- Bautista, N. d., Quiala, E., Agramante, D., Barbón, R., Camacho, W., Morejón, L., & Pérez, M. (Junio de 2004). Empleo de sistemas de inmersión temporal para la multiplicación in vitro de bordes de *Anthurium andraeanum* Lind. var. Lambada. *Biotechnología Vegetal*, 4(2), 97-100. Tabasco, México.
- Bayanati, M., & Mortazavi, S. N. (2013). International journal of Agronomy and Plant Production. *Micropropagation from Cultured nodal Explants of Rosa hybrida cv. Zanján*, Iran: VictorQuest Publication.
- Bejarano, W. (1992). Manual de Mora (*Rubus Glaucus Benth*). *PROEXANT*, 2.
- Bermudez, A. (1997). Problemas de la desvinculación de la investigación y la actividad productiva. *1 er Encuentro de productores agrícolas con la biotecnología*, 11-14.

- Berthouly, M., & Etienne, H. (2005). Temporary immersion system a new concept for use liquid medium in mass propagation. *Liquid culture system for in vitro plant propagation*, 165-195.
- Bhagyalakshmi, & Singh, N. (1995). Role of liquid versus agar-gelled media in mass propagation and ex vitro survival in bananas. *Plant Cell Tiss Org*, 41:71-73.
- Cabrera, M., Basail, M., Torres, Y., Robaina, A., Santos, A., Medero, V., . . . Oliva, M. (2004). Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal para multiplicación de segmentos nodales de *Dioscorea alata* L. en el clon 'Pacala Duclos'. *Biotecnología Vegetal*, 4.
- Cañas, B. (1993). Metodología in vitro de vegetales. *CO.UIS*.
- Cárdenas, Y. C. (2013). Evaluación agronómica y fenología de dos clones de mora sin espina (*Rubus glaucus* Benth) para determinar su potencial comercial. *Tesis de grado*. Universidad Central del Ecuador, Tumbaco, Ecuador.
- Casaca, A. (2005). *Guías Tecnológicas de Frutas y Vegetales*. Recuperado el 08 de 2013, de <http://www.zamorano.edu/gamis/frutas/mora.pdf>
- Castillo, A. (2011). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *Unidad de Biotecnología, INIA*.
- Castro, D., & Gonzales, J. (2002). Eucalyptus (*Eucalyptus gradis* Hill ex Maiden) micropropagation in a temporary immersion system. *Agricultura sostenible*, 68-78. Colombia.
- Castro, F. F. (2007). Establecimiento in vitro y pruebas preliminares de micropropagación en medio semisólido y líquido de frambuesa (*Rubus idaeus* L.).
- CIRAD, C. d. (2003). Recipiente con Inmersión temporal para cultivo de tejidos de plantas. *Las principales ventajas del sistema Rita*.
- Clouse, S., & Sasse, J. (1998). Brassionosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant physiol. Plant Mol. Biol.*, 49,427-451.
- Colmenares, M., & Giménez, C. (2005). Nuevas estrategias para la inducción de brotes en musáceas. *Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Zulia (Bio Ve-Luz)*, 1-20.

- Cruzat, R. (2009). Resultados y lecciones en sistema de inmersión temporal en especies anuales, frutales y vides. *Proyecto de innovación en las Regiones Metropolitanas, del Biobío y de los Ríos*, 7-13.
- Cubero, J. (2003). Introducción a la mejora genética vegetal. *Mundi-Prensa Libros. Segunda edición*, 353-364.
- Damiano, C., Gentile, A., La Starza, S., Frattarelli, A., & Monticelli, S. (2003). Automation in micropropagation through temporary immersion techniques. *Acta Horticulturae*, 616:359-364.
- De la Cruz, M. (01 de 04 de 2014). Multiplicación in vitro de caña en Sistema de Inmersión Temporal. (C. Zapata, Entrevistador)
- Debergh, P., Harbaoui, Y., & Lemeur, R. (1981). Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol Plant*, 53:181-187.
- Filgueira, J. (2010). Organogénesis directa en medio líquido en clavel en un biorreactor de bajo costo. *Laboratorio de Biotecnología Vegetal*.
- García, E. R. (1989). Propagación clonal de plantas de café (*Coffea arabica* L. catimor) a partir de microesquejes cultivados in vitro. *Universidad Central de Venezuela Facultad de Ciencias. Centro de Botánica*.
- George, E. (1993). Plant tissue culture techniques. (E. Ltd, Ed.) *Plant propagation by tissue culture*, 3-36.
- Harisha, S. (2007). Biotechnology procedures and experiments handbook infinity Science Press LLC. *Laxmi Publications*.
- Huanca, W. A. (1991). Métodos de reproducción asexual de plantas y sus aplicación. *Universidad Nacional del Altiplano del. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela Profesional de Ingeniería Agronómica*.
- Jambhale, N. P. (2000). Efecto de la cantidad de subcultivos en la multiplicación in vitro de cuatro clones de banano. *INFOMUSA*, 10(1).
- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). *Fisiología Vegetal*. La Serena, Chile: Ediciones Universidad de La Serena.
- Kalimuthu, K. P. (2007). *In vitro propagation of the biodiesel plant Jatropha curcas L. Plant Tissue Culture & Biotechnology*, 17 (2), 137 - 147. Recuperado el 07 de 2013, de <http://www.banlajol.info/index.php/PTCB/article/view/3234/2721>

- León, J. (1987). Botánica de los cultivos tropicales. *Instituto Internacional de Cooperación para la Agricultura*, 183.
- Lorenzo, J., Gonzáles, B., Escalona, M., Teisson, C., Espinosa, P., Borroto, C., & J, C. (1998). Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant cell, Tissue and Organ culture*, 54:197-200.
- Marin Velazquez, J. A. (1997). Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza. *La micropropagación y la mejora de especies frutales*. Zaragoza, España.
- Martínez, A., Beltrán, O., Ayala, G., Velastegui, G., Jácome, R., Yánez, W., & Luciano, E. (2007). Manual de cultivo de mora de castilla. *Convenio INIAP-UTA*, 9-16.
- Milagros, B., Kosky, R., Medero, V., Otero, E., Torres, M., Cabrera, M., . . . García, J. (01 de 2005). Influencia de reguladores e inhibidores de crecimiento en la multiplicación de brotes axilares de cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAAB) en Sistema de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal*, 6(1), 23-28. Villa Clara, Cuba.
- Morales, F. (26 de 10 de 2010). Estudios en las apocynaceae neotropicales XL: sinopsis del género *Prestonia* (Apocynoidea, Echteae) en Ecuador. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 67(1), 13-21.
- OIRSA. (2003). Proyecto Regional de Fortalecimiento de la vigilancia fitosanitaria en cultivo de exportación no tradicional. *Buenas prácticas agrícolas en mora orgánica*, 10.
- Pati, P., Sharma, M., Sood, A., & Ahuja, P. (Marzo de 2004). Direct shoot regeneration from leaf explants of *Rosa Damascena* Mill. *BioOne 2010 US/Canada*, 40(2), 192-195.
- Paucar, M. (2011). *Organogénesis directa in vitro a partir de explantes de hojas de mora (Rubus glaucus Benth)*. Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de ciencias de la vida, Sangolquí.
- Pérez, J., Ponce, N., Jiménez, A., & Agramonte, D. (1998). Aumento de la Eficiencia en la Micropropagación. *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*, 1, 179-191.
- Pierik, R. (1990). Cultivo in vitro de las plantas superiores. *L.M.S., Ayerbe, Trad. Mundi-Prensa*.

- Popenoe, W. (1921). Fruit bearing plants of Ecuador. *Economic fruit-bearing plants of Ecuador*, 101-134.
- Ramírez, T. (2009). *Perfiles de mercado de mora*. Recuperado el 2013, de CORPEI: <http://www.pucesi.edu.ec/pdf/mora.pdf>
- Roca, W., & Mroginski, L. (1993). Cultivo de tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. *CIAT*.
- Rodrigo, G. (2009). Sistema de Inmersión Temporal en Especies Anuales, Frutales y Vides. *Fundación para la Innovación Agraria*.
- Rodríguez, K., Aranguren, M., & Farrés, E. (2005). Efecto del paclobutrazol en el desarrollo vegetativo e inicio de la floración en dos cultivares de mango (*Mangifera indica* L.). *Instituto de Investigación en Fruticultura Tropical*. Cuba.
- Rojas, S., García, J., & Alarcón, M. (2004). Propagación asexual de plantas: Conceptos Básicos y Experiencias con Especies Amazónicas. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria, Produmedios*.
- Romolerux, K. (1996). Flora of Ecuador. *Herbario, Departamento de Biología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador*, 5-6.
- Rosales, E., Rodríguez, L., Alvarado, O., & Cárdenas, M. (2003). Diseño y construcción de un sistema de inmersión temporal. *Centro Agrícola F.A.U.A.N.L.*
- Sigarroa, A., & García, C. (2011). Establecimiento y multiplicación in vitro de mora de castilla (*Rubus Glaucus* Benth) variedad sin espina, mediante ápices meristemáticos.
- Soberón, J., Quiroga, E., Sampietro, A., & Vattuone, M. (2005). Giberelinas. *Universidad Nacional de Tucumán*, http://www.biologia.edu.ar/plantas/reguladores_vegetales_2005/giberelinas.htm. Recuperado el 31 de 8 de 2013, de http://www.biologia.edu.ar/plantas/reguladores_vegetales_2005/giberelinas.htm
- Squeo, F. A., & Cardemil, L. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. En *Fisiología Vegetal*. La Serena, Chile: Universidad de La Serena.

- Stewart, C. (2008). Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques, and Applications. *University of Tennessee*.
- Torres, J., & Mogollón, N. (2002). Efecto del PBZ sobre la brotación y el desarrollo in vitro de la epidermis foliar de *Cattleya mossiae parker ex hooler* previo a la aclimatación. *Bioagro*, 25-28.
- Villapudua, J., & Sáinz, R. (2005). *Producción de semilla de papa (Solanum tuberosum L.)*. Universidad Autónoma de Sinaloa y Agrobiológica.
- Ziv, M. (1990). The effect of growth retardants on shoot proliferation and morphogenesis in liquid cultured *Gladiolus* plants. . *Acta horticulturae*, 280:207-214.