



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

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

**TEMA “ESTUDIO DEL EFECTO HORMÉTICO Y ANTIMICROBIANO
DE NANOPLATA EN LA REGENERACIÓN *IN VITRO* EN MORA DE
CASTILLA (*Rubus glaucus*)”**

AUTOR: PÁRAMO CABRERA, CARLOS IVÁN

DIRECTOR: ING. LANDÁZURI ABARCA, PABLO ANÍBAL

SANGOLQUÍ

2018

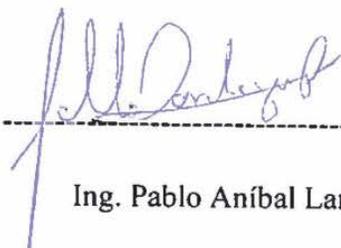


DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación *“ESTUDIO DEL EFECTO HORMÉTICO Y ANTIMICROBIANO DE NANOPLATA EN LA REGENERACIÓN IN VITRO EN MORA DE CASTILLA (Rubus glaucus)”* realizado por el señor *Páramo Cabrera Carlos Iván*, ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 20 de febrero del 2018



Ing. Pablo Aníbal Landázuri Abarca

CC: 170826234-8

DIRECTOR



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *Páramo Cabrera Carlos Iván*, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: *Estudio del efecto hormético y antimicrobiano de nanoplata en la regeneración in vitro en mora de castilla (Rubus glaucus)* es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 20 de febrero del 2018

Carlos Iván Páramo Cabrera

C.C. 172401358-4



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN

Yo, Páramo Cabrera Carlos Iván, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: Estudio del efecto hormético y antimicrobiano de nanoplasta en la regeneración in vitro en mora de castilla (Rubus glaucus) en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 20 de febrero del 2018

Carlos Iván Páramo Cabrera

C.I. 172401358-4

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a toda mi familia, en principal a mis queridos padres Rosa y Wilfrido, mis hermanos Cristian, Carla y Sebastián, ya que sin ellos no hubiera llegado a estas instancias, por su esfuerzo, su apoyo incondicional y en especial a ese angelito que me acompaña ahora desde el cielo Cris R.D.P (Chitolin), quien me demostró a valorar la vida y a seguir siempre adelante cuando las circunstancias sean adversas.

Carlos Páramo

AGRADECIMIENTO

A mis padres y mi familia, por ser un apoyo incondicional en los buenos y malos momentos, sin ellos no hubiera llegado a ningún lugar, sin sus consejos y palabras de aliento, lo cual me permitió seguir con mis sueños y propósitos de la vida.

A mi Chitolin ya que me dejó una lección de vida y nunca darme por vencido aun cuando el panorama sea el peor, a valorar a las personas y a la vida.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, IASA y a todo el personal docente que por todos los conocimientos impartidos en estos años de formación académica.

En especial, a mí querido director y tutor Ing. Pablito Landázuri, quien con su apoyo y paciencia logré realizar mi trabajo de titulación.

A mis amigos con quienes he vivido aquellas experiencias de la vida universitaria a lo largo de esta linda carrera, a mis queridos AFAS, a Katty, Leis, Karen, Michu, Vale y Sol que han sido parte fundamental para poder salir adelante cuando las circunstancias eran adversas, además de compartir momentos inolvidables a su lado.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA

CERTIFICACIÓN	ii
AUTORIA DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS	xvi
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xviii

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Justificación.....	2
1.3 Planteamiento del problema	3
1.3.1 Los efectos.....	3
1.3.2 Las causas.....	3
1.4 Objetivos	4
1.4.1 Objetivo General	4
1.4.2 Objetivos específicos.....	4
1.5 Hipótesis.....	4

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

5

2.1	Cultivo de mora de castilla.....	5
2.2	Descripción botánica	5
2.3	Taxonomía.....	5
2.4	Ciclo del cultivo	6
2.5	Propagación de mora de castilla (<i>R. glaucus</i>)	6
2.6	Acodo de punta terminal	6
2.6.1	Estacas	7
2.6.2	Acodo Aéreo.....	7
2.7	Cultivo <i>in vitro</i>	7
2.8	Micropropagación	8
2.8.1	Ventajas de la micropropagación	8
2.8.2	Inconvenientes de la micropropagación	9
2.8.3	Fases de la micropropagación	9
2.8.4	Fase 0 o fase preparativa	9
2.8.5	Fase 1 de establecimiento o introducción.....	9
2.8.6	Fase 2 de multiplicación.....	10
2.8.7	Fase 3 de enraizamiento	10
2.9	Nanoplata.....	11
2.9.1	Usos de la nanoplata.....	11
2.10	AgROVIT.....	12
2.10.1	Caracterización de las nanopartículas de plata.....	12
2.11	Efecto hormético u hormesis.....	13

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

14

3.1	Ubicación del lugar de investigación	14
3.1.1	Ubicación política.....	14
3.1.2	Ubicación geográfica.....	14
3.1.3	Condiciones de laboratorio.....	14
3.2	Materiales	14
3.2.1	Varios	14
3.2.2	Insumos de laboratorio	14
3.2.3	Reactivos	14
3.2.4	Equipos.....	15
3.3	Métodos	15
3.3.1	Determinación del efecto antimicrobiano de cuatro dosis de nanoplatina en medio MS en la fase de introducción <i>in vitro</i> en mora de castilla (<i>Rubus glaucus</i>).	15
3.3.1.1	Diseño experimental.....	15
3.3.1.1.1	Factores a probar	15
3.3.1.1.2	Tratamientos a comparar	15
3.3.1.1.3	Tipo de diseño	16
3.3.1.1.4	Repeticiones o bloques.....	16
3.3.1.1.5	Características de las unidades experimentales.....	16
3.3.1.1.6	Croquis experimental	17
3.3.1.1.7	Análisis estadístico.....	17
3.3.1.1.8	Mediciones experimentales en la fase de introducción <i>in vitro</i> en mora de castilla.....	17

3.3.1.1.8.1	Porcentaje y presencia de contaminación <i>in vitro</i>	18
3.3.1.1.8.2	Porcentaje y presencia de fenoles en el medio de cultivo	18
3.3.1.1.8.3	Número de brotes	19
3.3.1.1.8.4	Altura del brote y número de hojas	19
3.3.1.1.9	Métodos específicos del experimento en la fase de <i>introducción in vitro</i> en mora de castilla (<i>R. glaucus</i>).....	19
3.3.1.1.9.1	Obtención del material vegetal (explantes).....	19
3.3.1.1.9.2	Desinfección del material vegetativo pre cámara.....	19
3.3.1.1.9.3	Desinfección del material vegetativo en la cámara de flujo laminar.	20
3.3.1.1.9.4	Desarrollo de la fase de introducción con explantes de mora de castilla (<i>R. glaucus</i>).....	20
3.3.2	Evaluación del efecto hormético de cuatro dosis de nanoplata en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> en mora de castilla (<i>Rubus glaucus</i>).	21
3.3.2.1	Diseño experimental.....	21
3.3.2.1.1	Factores a probar	21
3.3.2.1.2	Tratamientos a comparar	21
3.3.2.1.3	Tipo de diseño	22
3.3.2.1.4	Repeticiones o bloques.....	22
3.3.2.1.5	Características de las unidades experimentales.....	22
3.3.2.1.6	Croquis experimental	23
3.3.2.1.7	Análisis estadístico	23
3.3.2.1.8	Mediciones experimentales en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de mora de castilla.....	23
3.3.2.1.8.1	Número de brotes	24

3.3.2.1.8.2	Altura de brotes y número de hojas.....	24
3.3.2.1.8.3	Porcentaje y presencia de contaminación <i>in vitro</i>	24
3.3.2.1.8.4	Porcentaje y presencia de fenoles en el medio de cultivo	24
3.3.2.1.8.5	Clorofila A, B y Total.....	25
3.3.2.1.9	Métodos específicos del experimento en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de mora de castilla (<i>R. glaucus</i>).	25
3.3.2.1.9.1	Medio de cultivo para la fase de multiplicación.....	25
3.3.2.1.9.2	Desarrollo de la fase de multiplicación <i>in vitro</i> con brotes de mora de castilla (<i>R. glaucus</i>).	26
3.3.3	Determinación del efecto hormético sobre el sistema radicular de cuatro dosis de nanoplata, en la fase de enraizamiento en vitroplantas de mora de castilla (<i>Rubus glaucus</i>).....	26
3.3.3.1	Diseño experimental.....	26
3.3.3.1.1	Factores a probar	26
3.3.3.1.2	Tratamientos a comparar	27
3.3.3.1.3	Tipo de diseño	27
3.3.3.1.4	Repeticiones o bloques.....	27
3.3.3.1.5	Características de las unidades experimentales.....	27
3.3.3.1.6	Croquis experimental	28
3.3.3.1.7	Análisis estadístico	28
3.3.3.1.8	Mediciones experimentales en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de mora de castilla.....	28
3.3.3.1.8.1	Altura de la vitroplanta (cm) y número de hojas.....	29
3.3.3.1.8.2	Número de raíces de raíces desarrolladas.....	29

3.3.3.1.8.3	Porcentaje de enraizamiento del tratamiento.....	29
3.3.3.1.8.4	Clorofila A, B y Total.....	29
3.3.3.1.8.5	Porcentaje y presencia de contaminación <i>in vitro</i>	29
3.3.3.1.8.6	Porcentaje y presencia de fenoles en el medio de cultivo	30
3.3.3.1.9	Métodos específicos del experimento en la fase de <i>enraizamiento in vitro</i> de mora de castilla (<i>R. glaucus</i>).....	30
3.3.3.1.9.1	Medio de cultivo.....	30
3.3.3.1.9.2	Desarrollo de la fase de enraizamiento con brotes de mora de castilla (<i>R. glaucus</i>).....	31

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 32

4.1	Evaluación de diferentes dosis de nanoplata en la regeneración <i>in vitro</i> de mora de castilla (<i>Rubus glaucus</i>) para determinar el efecto antimicrobiano en el medio de cultivo.	32
4.2	Evaluación de diferentes dosis de nanoplata en la regeneración <i>in vitro</i> de mora de castilla (<i>Rubus glaucus</i>) para determinar el efecto en la fenolización en el medio de cultivo.....	34
4.3	Evaluación de diferentes dosis de nanoplata en la fase de multiplicación y enraizamiento <i>in vitro</i> de mora de castilla (<i>Rubus glaucus</i>) en la determinación del contenido de clorofila A, B y Total.....	36
4.4	Evaluación de diferentes dosis de nanoplata en la fase de introducción <i>in vitro</i> de mora de castilla (<i>Rubus glaucus</i>) para el análisis del efecto hormético en el número de brotes, alturas de brotes y números de hojas.	37

4.5	Evaluación de diferentes dosis de nanoplata en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de mora de Castilla (<i>Rubus glaucus</i>) para el análisis del efecto hormético en el número de brotes, alturas de brotes y número de hojas de brotes.	40
4.6	Evaluación de diferentes dosis de nanoplata en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de mora de Castilla (<i>Rubus glaucus</i>) para el análisis del efecto hormético en el desarrollo radicular de vitroplantas.	43

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 47

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

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Niveles de adición de nanoplasta en el medio de cultivo en la fase de introducción.....	15
Tabla 2	Esquema del análisis de Varianza (ANAVA) de la fase de introducción <i>in vitro</i> en mora de castilla (<i>R. glaucus</i>).....	16
Tabla 3	Escala de medición de contaminación en la fase de introducción <i>in vitro</i> de mora de castilla.	18
Tabla 4	Escala de medición de fenolización en la fase de introducción <i>in vitro</i> de mora de castilla.	18
Tabla 5	Niveles de adición de nanoplasta al medio de cultivo en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de mora de castilla.....	21
Tabla 6	Esquema del análisis de Varianza (ANAVA) en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> en mora de castilla (<i>R. glaucus</i>).....	22
Tabla 7	Escala de medición de contaminación en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de mora de castilla.	24
Tabla 8	Escala de medición de fenolización en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de mora de castilla.	25
Tabla 9	Niveles de adición de nanoplasta al medio de cultivo en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de mora de castilla.....	26
Tabla 10	Esquema del análisis de varianza (ANAVA) en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> en mora de castilla (<i>R. glaucus</i>).	27
Tabla 11	Escala de medición de contaminación en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de mora de castilla.	30
Tabla 12	Escala de medición de fenolización en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de mora de castilla.	30
Tabla 13	Porcentaje y presencia de contaminación en la regeneración <i>in vitro</i> de mora de castilla (<i>R. glaucus</i>) en el medio de cultivo.	33
Tabla 14	Porcentaje de fenolización en la regeneración <i>in vitro</i> de mora de castilla (<i>R. glaucus</i>) en el medio de cultivo.	35

Tabla 15 Promedio \pm error estándar de las medias de clorofila según los tratamientos de nanoplata en la fase de multiplicación.	36
Tabla 16 Promedio \pm error estándar de las medias de clorofila según los tratamientos de nanoplata en la fase de enraizamiento.	37
Tabla 17 Promedio \pm error estándar de los valores del desarrollo de brotes, tamaño de brotes y número de hojas.	37
Tabla 18 Promedio \pm error estándar de los resultados del desarrollo de brotes, tamaño de brotes principales - nuevos y numero de hojas	41
Tabla 19 Promedio \pm error estándar de los resultados del desarrollo de hojas, altura y raíces de la vitroplanta.	44
Tabla 20 Porcentaje de enraizamiento de los tratamientos	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Cultivo mora de Castilla	5
Figura 2	Cultivo in vitro Stevia.....	8
Figura 3	Proceso de micropropagación de mora de castilla.....	8
Figura 4	Proceso de poda en el cultivo de mora de castilla	9
Figura 5	Microestacas de mora de castilla en medio de cultivo.....	10
Figura 6	Brotos de mora de castilla en la fase de multiplicación	10
Figura 7	Brotos enraizados de mora de castilla a los 45 días	11
Figura 8	Curva del efecto hormético.....	13
Figura 9	Distribución de tratamientos en la fase de introducción.....	17
Figura 10	Cultivo de mora de castilla, colección frutales IASA.....	19
Figura 11	Desinfección pre cámara con varetas de mora de castilla	20
Figura 12	Microestacas desinfectadas dentro de la cámara de lujo laminar	20
Figura 13	Distribución de tratamientos en la fase de multiplicación	23
Figura 14	Distribución de tratamientos en la fase de enraizamiento	28
Figura 15	Respuesta de la curva hormética mediante la concentración de nanopartículas de plata en la fase de introducción in vitro de microestacas de mora de castilla (<i>R. glaucus</i>) después de 20 días de cultivo <i>in vitro</i>	38
Figura 16	Respuesta de la curva hormética mediante la concentración de nanopartículas de plata en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de brotes de mora de castilla (<i>R. glaucus</i>) después de 90 días de cultivo <i>in vitro</i>	42
Figura 17	Respuesta de la curva hormética mediante la concentración de nanopartículas de plata en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de brotes de mora de castilla (<i>R. glaucus</i>) después de 45 días de cultivo <i>in vitro</i>	45

RESUMEN

Una alternativa de las nuevas tecnologías de propagación cultivos andinos es la micropropagación o cultivo de tejidos, lo que permite obtener plantas clonales de altas características genéticas y logrando altos rendimientos, evitando mortalidad y problemas fitosanitarios con la propagación tradicional. Una desventaja de la micropropagación, es la contaminación ocasionada por microorganismos, que provoca un bajo desarrollo del explante; por lo tanto, el objetivo de este estudio es evaluar el efecto hormético y antimicrobiano de la nanoplata en la regeneración *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus*), que consiste en introducción (20 días), multiplicación (90 días) y enraizamiento (45 días). Se evaluaron en las tres fases, cinco dosis de nanoplata 0, 25, 50, 75 y 100 mg.L⁻¹ de medio de cultivo MS al 50% de concentración, en condiciones de crecimiento, luz blanca de 60 watts, luz PAR de 14,6 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y 62% de humedad relativa. Los resultados demostraron que dosis de 50, 75, 100 mg de nanoplata en la regeneración de mora, inhiben el desarrollo de microorganismos y la presencia de fenoles en el medio de cultivo, destacándose en las tres fases la dosis de nanoplata de 50 mg, obteniendo mayor efecto hormético en la fase de introducción, 2.2 brotes.explante⁻¹, altura de 2.3 cm y 5.6 hojas, la fase de multiplicación se obtuvo un factor de 2.6, altura del brote de 4,02 cm y 26.40 hojas; en la fase de enraizamiento se obtuvo una altura de vitroplanta de 2.82 cm, 23.40 hojas, con 3.40 raíces y longitud de 3.38 cm.

PALABRAS CLAVE:

- MICROPROPAGACION
- REGENERACIÓN
- HORMÉTICO
- NANOPLATA

ABSTRACT

An alternative of the new technologies of propagation of Andean crops is the micropropagation or cultivation of tissues, which allows obtaining clonal plants with high genetic characteristics and achieving high yields, avoiding mortality and phytosanitary problems with traditional propagation. A disadvantage of micropropagation is the contamination caused by microorganisms, which causes a low development of the explant; therefore, the objective of this study is to evaluate the hormetic and antimicrobial effect of nanosilver on *in vitro* regeneration of blackberry (*Rubus glaucus*), which consists of introduction (20 days), multiplication (90 days) and rooting (45 days). In the three phases, five doses of nanosilver 0, 25, 50, 75 and 100 mg.L⁻¹ of MS culture medium at 50% concentration were evaluated under growth conditions, white light of 60 watts, PAR light of 14.6 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and 62% relative humidity. The results showed that doses of 50, 75, 100 mg of nanosilver in the regeneration of blackberry, inhibit the development of microorganisms and the presence of phenols in the culture medium, standing out in the three phases the 50 mg nanosilver dose, obtaining Higher effect hormetic in the phase of introduction, 2.2 shoots.explant⁻¹, height of 2.3 cm and 5.6 leaves, the multiplication phase was obtained a factor of 2.6, shoot height of 4.02 cm and 26.40 leaves; in the rooting phase, a height of vitroplant of 2.82 cm, 23.40 leaves, with 3.40 roots and a length of 3.38 cm was obtained.

KEYWORDS:

- **MICROPROPAGATION**
- **REGENERATION**
- **HORMETIC**
- **NANOSILVER**

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

En la actualidad la nanoplata es estudiada en diferentes áreas como medicina, producción de textiles y en la regeneración de tejidos. El Instituto de la Plata en Estados Unidos, en el año 2010, estudió que la nanoplata actúa en la coagulación sanguínea en ratones, demostrando que controla efectivamente en la acumulación de plaquetas independientemente de la causa de las enfermedades, ya que las dosis de anticoagulantes son muy difíciles de determinar y pueden provocar la muerte del paciente.

En algunos estudios realizados por (Aguilar, 2009) en México, parte de la investigación fue la evaluación *in vitro* de la actividad anti fúngica de nanopartículas de plata en *Colletotrichum gloesporioides*, obteniendo como resultados una disminución del 89% en la velocidad de crecimiento micelial con un tamaño de partículas de nanoplata de 23.8nm.

(Spinoso, y otros, 2017), evaluaron el efecto antimicrobiano y hormético de nano partículas de plata *in vitro* en regeneración de vainilla, usando un sistema temporal de inmersión (SIT); las dosis de nanoplata (Argovit) utilizadas fueron 0, 25, 50,100 y 200 mg.L⁻¹; donde la contaminación *in vitro* fue nula en dosis de Argovit con 50, 100 y 200 mg.L⁻¹; el tratamiento de 50 mg.L⁻¹ del producto presentó un mayor número de brotes (14.89 por explante) y una longitud de brotes (4.71 cm), comparados con el testigo en el que se observó un número de brotes de 9.25 por explante y 2.15 cm de longitud.

En Colombia se analizó el efecto del ancymidol y el nitrato de plata sobre el crecimiento de lulo (*Solanum quitoense*) y tomate de árbol (*Solanum betaceum*), conservados *in vitro*, donde se obtuvo que el nitrato de plata en el cultivo de lulo ha mostrado un efecto benéfico, permitiendo reducir el crecimiento con el fin de prolongar el tiempo del subcultivo y la recuperación de los tejidos, mejorando la estabilidad genética.

En Ecuador, estudios realizados por (Sagñay, 2009) en cuyes (*Cavia porcellus*), sobre la actividad de la nanoplata sobre microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aglomerans* probados a una concentración de

1.5×10^3 células.mL⁻¹ y de nanoplata de 20ug.mL⁻¹; se demostró que a una exposición de 40 minutos, se logró controlar hasta el 99,9% de los microorganismos mencionados e inclusive se observó una reducción en la población de los ácaros y una recuperación de lesiones. La nanoplata también ha sido analizada sobre la actividad antimicrobiana en mastitis subclínica bovina, (Valdiviezo, 2007), quien demostró que a una concentración de 7 ppm se reduce el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en un 92,1% en 60 minutos de *Escherichia coli* en un 99,4% en 30 minutos, además de reducir las UFC.mL⁻¹.

(Proaño, 2011), utilizó nitrato de plata en regeneración y conservación mediante la técnica de crecimiento mínimo del chocho andino *in vitro*, destacando los resultados en crecimiento de la planta a 10 ppm de nitrato de plata (AgNO₃) donde el valor más alto fue de 4.70 cm en comparación con los 10 ppm de cloruro trimetil amonio (CCC) que se obtuvo un valor de 0.78 cm. En cuanto la variable número de brotes con 10 ppm de CCC, fue de 0.89 por explante y con 10 ppm de AgNO₃, fue 6.44 por explante.

1.2 Justificación

En Ecuador existen aproximadamente 5.142 has. de mora de castilla; que se encuentran en terrenos de productores pequeños y medianos; el rendimiento logrado es bajo, 3kg.planta⁻¹. ciclo⁻¹, ya que se considera óptimo cuando se alcanzan 5kg.planta⁻¹.ciclo⁻¹ (INEN, 2010). Los bajos rendimientos se deben a diversos problemas tales como el mal manejo agronómico, un inadecuado control de plagas y enfermedades en las plantaciones, como también la gran cantidad de variabilidad genética de las plantas de mora en cultivo, lo que genera una producción heterogénea (Dicyt, 2008).

Las plantas producidas mediante las metodologías actuales de propagación asexual, presentan un alto porcentaje de mortalidad al trasplante, debido a problemas fitosanitarios y a un sistema radicular débil. La micropropagación de mora consiste en obtener una descendencia uniforme e idéntica a una planta madre, a partir de un fragmento (explante) con lo que se obtienen clones de una planta de altas características genéticas, permitiendo a los productores tener altos rendimientos. Un problema, es la desinfección de los explantes en laboratorio; en ciertas ocasiones se utilizan métodos como detergente comercial e hipoclorito de sodio, los cuales ocasionan daños en los explantes (Perez , 2006).

La biotecnología en la producción de nano partículas de plata, aplicada en el tratamiento de algunas enfermedades de plantas causadas por hongos y bacterias disminuye la contaminación. El mecanismo de acción de la nanoplata es la combinación con paredes celulares de bacterias patógenas, con lo cual se consigue una rápida penetración en la bacteria y una vez dentro, con igual rapidez, se combina con el sulfhidrilo (-SH) de la enzima metabólica oxigénica para desactivarlas, lo cual bloquea la respiración y su metabolismo. En el caso de hongos, inhibe el desarrollo del micelio (The Silver Institute, 2010).

1.3 Planteamiento del problema

La contaminación y fenolización en el medio de cultivo es un problema que se da en la micropropagación de plantas. Los contaminantes más comunes son bacterias, hongos y levaduras que ocasionan pérdidas económicas y de tiempo. En el caso de la mora de castilla, esta contiene bacterias saprófitas que no ocasionan ningún daño en la planta; sin embargo, al momento de separar la microestaca y realizar la introducción del explante al medio de cultivo, estas bacterias se desarrollarán, originando la contaminación dentro del envase, ocasionando bajos desarrollos de estructuras vegetales.

1.3.1 Los efectos

Existe contaminación en el medio de cultivo, por lo cual se presenta un mal desarrollo del explante con una alta tasa de mortalidad, lo que incrementa los costos de producción.

1.3.2 Las causas

No se realiza un manejo integral de plagas y enfermedades en la planta madre, para que las condiciones fitosanitarias sean óptimas ya que esta será la donante del material vegetal y sin un control apropiado, afectará posteriormente a los explantes.

La aplicación incorrecta de diferentes protocolos de desinfección en las fases de micropropagación de mora, provoca un incorrecto crecimiento del explante y la pérdida de material vegetal valioso. El explante, al afectarse por el desarrollo inadecuado durante la introducción, ocasiona la pérdida de medios y partes vegetativas, con el consecuente incremento de los costos de producción. Además, el uso de agentes antibióticos y fúngicos, provoca resistencia en los microorganismos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto hormético y antimicrobiano de la nanoplata en la regeneración *in vitro* en la mora de castilla (*Rubus glaucus*).

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto antimicrobiano de cuatro dosis de nanoplata en medio MS en la fase de introducción *in vitro* en mora de castilla (*Rubus glaucus*).
- Evaluar el efecto hormético de cuatro dosis de nanoplata en la fase de multiplicación *in vitro* en mora de castilla (*Rubus glaucus*).
- Determinar el efecto hormético sobre el sistema radicular de cuatro dosis de nanoplata en la fase de enraizamiento en vitroplantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*).

1.5 Hipótesis

H0: La nanoplata genera un efecto bioestimulante y antimicrobiano en la regeneración de mora de castilla (*Rubus glaucus*) *in vitro*.

H1: La nanoplata no genera un efecto bioestimulante y antimicrobiano en la regeneración de mora de castilla (*Rubus glaucus*) *in vitro*.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Cultivo de mora de castilla

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) es una fruta muy apetecida tanto en el mercado nacional como en el internacional. Actualmente se conocen numerosas especies de moras en las zonas altas de América Tropical, encontrándose principalmente en la cordillera de los Andes de Ecuador y Colombia. Es una planta de origen silvestre. Esta fruta es muy codiciada por las personas, debido a que es un recurso alimenticio de excelente calidad, rico en minerales y vitaminas (CICO , 2009).



Figura 1 Cultivo mora de Castilla
Fuente: (Guerrón & Espinoza, 2015)

2.2 Descripción botánica

Es una planta de vegetación perenne, arbustiva semi-erecta, conformada por varios tallos espinosos que pueden llegar a medir hasta tres metros; las hojas tiene tres folíolos y presenta espinas; la corona está conformada por una gran cantidad de raíces superficiales, el sistema radicular llega a profundizar hasta un metro, dependiendo del tipo suelo y de subsuelo (Martínez , y otros, 2007). El fruto es pequeño, tiene un color que va desde rojo a negro brillante, tiene un sabor agridulce cuando es tierna, mientras que cuando ya está madura, es dulce, su pulpa es rojiza y presenta entre 100 a 120 semillas (MAGAP, 2013).

2.3 Taxonomía

Distintos autores clasifican a la mora de castilla de la siguiente manera: Reino: Vegetal, Clase: Angiosperma, Orden: Rosae, Familia: Rosaceae, Género: *Rubus*, Especie: *glaucus*,

floribundus, *gigantus*, etc. Nombre científico: *Rubus glaucus* Nombre vulgar: mora (Martínez , y otros, 2007).

2.4 Ciclo del cultivo

La mora presenta tres etapas de desarrollo:

La primera consiste en obtener nuevas plantas, sea de una forma sexual o asexual; la segunda es la formación y el desarrollo vegetativo; y, la tercera etapa, es de la productividad que inicia a partir de los ocho meses después del trasplante y que se mantendrá mantenerse durante varios años (Martínez , y otros, 2007).

2.5 Propagación de mora de castilla (*R. glaucus*)

La mora se puede propagar sexual o asexualmente, pero el método recomendado comercialmente es el asexual, por ser más económico. La reproducción sexual no se emplea sino solo experimentalmente, porque las semillas tienen un bajo poder germinativo (Aguinaga & Guanotuña , 2013).

La propagación vegetativa o clonación, se define como la reproducción de la planta a partir de una célula de un tejido, un órgano (raíz, tallo, ramas, hojas). Esto se debe a que muchas células de los tejidos diferenciados (maduros) de la planta, conservan totipotenciabilidad, con esta característica, una célula adulta puede retomar la activa meristemática y multiplicarse dando origen a los órganos vegetativos (Rojas , Garcia, & Alarcon, 2004).

Según (Vásquez , Orozco, Rojas , Sánchez , & Cervantes , 1997), la propagación vegetativa tiene tres variantes; la primera, la propagación por partes vegetativas como rizomas, bulbos, tubérculos, estolones y segmentos de órganos como tallos y hojas. La segunda propagación por injertos, es donde un segmento de una planta se adhiere a otra receptiva más resistente o con mejores características y por último, se tiene la propagación *in vitro*, en la cual las células o pequeñas partes de tejidos, son cultivados en condiciones controladas de laboratorio.

2.6 Acodo de punta terminal

Este método de propagación consiste en dar vida a nuevas plantas en las ramas de la planta madre, pero cabe recalcar que no se las procede a cortar. La planta madre que se utilizará debe estar

sana; este método consiste en despuntar y deshojar la parte que va ser introducida en la funda (MAGAP, 2013).

2.6.1 Estacas

La propagación por estacas consiste en el corte de trozos de 35 cm. de tallos vigorosos y de buenas características. El diámetro de los tallos debe ser de 1 cm. Y cada estaca debe tener de tres a cuatro yemas. Con el fin de tener un buen enraizamiento, es necesario aplicar fitohormonas en la parte inferior de las estacas y parafina en la parte superior para reducir la deshidratación y el ingreso de patógenos. La propagación por estacas presenta algunas características como un rápido brotamiento de las yemas, formándose pequeñas ramas sin que exista aún el sistema radicular, por lo que este crecimiento se detiene pronto. Con el fin de obviar este crecimiento, los cortes del tallo deben hacerse cerca de las yemas y después de la siembra, mantener las estacas en un lugar cubierto y oscuro para evitar el brote de las yemas (Delgado, 2012).

Las estacas se enraízan en sustratos o en suelos ricos en materia orgánica y con capacidad de retención de humedad (Soria , Padilla , & Larrea, 2011).

2.6.2 Acodo Aéreo

Consiste en elegir un tallo vigoroso. Se realiza una herida superficial alrededor del tallo a la mitad de la rama, se lo cubre con tierra, al cabo de uno a dos meses, se desarrolla un sistema radicular en esa sección, se separa el acodo de la planta madre y se planta (Soria , Padilla , & Larrea, 2011).

2.7 Cultivo *in vitro*

Se define como el cultivo de células, tejidos, órganos, embriones y plantas enteras, en condiciones asépticas en un ambiente controlado, dentro de envases adecuados con medio nutritivo (Perez , 2006).



Figura 2 Cultivo *in vitro* de Stevia

2.8 Micropropagación

Es un método de propagación vegetativa, que permite la producción a gran escala de plantas madres libres de agentes patógenos, incluyendo virus en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. El cultivo *in vitro* es una herramienta muy importante y útil para los programas de mejoramiento ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad, a partir de genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada (Rojas , Garcia, & Alarcon, 2004).



Figura 3 Proceso de micropropagación de mora de castilla

2.8.1 Ventajas de la micropropagación

Con la micropropagación se busca obtener una producción de vitroplantas en un espacio pequeño y a lo largo de todo el año, los costos de producción son bajos debido a que se economiza energía y espacio en invernaderos. El material a utilizarse se lo ocupa en pequeñas cantidades, permite propagar especies de plantas que presentan dificultad por los métodos tradicionales y

permite eliminar enfermedades de las plantas causadas por virus o bacterias (Berries Argentina, 2015).

2.8.2 Inconvenientes de la micropropagación

La contaminación endógena y la presencia de fenoles, complican el desarrollo de los brotes, la adaptación en campo de vitroplantas, aparte de ser un proceso difícil, es costoso por la tecnología a aplicarse, se requiere personal de laboratorio especializado (Gonzales & Vilca, 1998).

2.8.3 Fases de la micropropagación

La obtención de plantas idénticas de características particulares iguales a la planta madre, es el objetivo de la micropropagación. Al seleccionarse un material idóneo para la micropropagación, se diseña el protocolo que consta de las fases: Fase 0, preparativa; Fase 1, de establecimiento o introducción; Fase 2, de multiplicación; Fase 3, de enraizamiento; y, Fase 4, de aclimatización o adaptación al suelo. Estas fases dependen del material vegetal que se cultivará *in vitro* (Perez , 2006).

2.8.4 Fase 0 o fase preparativa

Las plantas madre de donde se obtendrá el material vegetal para la micropropagación, deberán ser las adecuadas, por lo se aplica tratamientos especiales o tratamientos previos para la selección del material (Perez , 2006).



Figura 4 Proceso de poda en el cultivo de mora de castilla

2.8.5 Fase 1 de establecimiento o introducción

En esta fase consiste en el aislamiento del material vegetal a cultivarse *in vitro*, sea un explante o una parte vegetativa de la planta madre; se diseña un protocolo para la introducción al

envase con medio nutritivo. El final de esta fase se produce cuando las yemas axilares formadas en los explantes, están en condiciones de ser separadas y cultivadas en medios nutritivos de multiplicación (Perez , 2006).



Figura 5 Microestacas de mora de castilla en medio de cultivo

2.8.6 Fase 2 de multiplicación

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la calidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos (subcultivos). Cuando el callo tiene un buen crecimiento sin la presencia de alguna contaminación, se lo pasa a un nuevo medio de cultivo, con la adición de algunas fitohormonas que favorezcan al proceso de organogénesis (Rojas , Garcia, & Alarcon, 2004).

“La obtención del mayor número de nuevas yemas axilares en el menor tiempo posible, es fundamental la tasa de multiplicación del cultivo, se define como el número de yemas viables producidas a partir de cada yema de cada subcultivo (Perez , 2006)”.



Figura 6 Brotes de mora de castilla en la fase de multiplicación

2.8.7 Fase 3 de enraizamiento

En esta etapa se produce la formación de raíces adventicias. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el enraizamiento *in vitro*, pueden

emplearse varios sustratos y fitohormonas, como las auxinas que promueven la rizo génesis. Los sustratos consisten en un medio solidificado, los nutrientes y la sacarosa se reducen a la mitad de la concentración original. En el incremento de los porcentajes de enraizamiento de vástagos axilares de plantas latifoliadas, lo más recomendable es que los medios tenga una baja concentración salina (Rojas , Garcia, & Alarcon, 2004).

Los brotes que provienen de la etapa de multiplicación, deben tener un buen tamaño y por lo menos de 4 a 5 yemas. El enraizamiento *ex vitro* permite que el enraizamiento y la aclimatización se logren simultáneamente, y es muy raro que se forme callo en la base de las estacas, así asegurando una conexión vascular continúa con el vástago y la raíz. Pero existe un incremento de mortalidad en los brotes, debido a que se los somete a un estrés asociado a la transpiración acelerada de las plantas durante las etapas iniciales del trasplante (Martínez , y otros, 2007).



Figura 7 Brotes enraizados de mora de castilla a los 45 días

2.9 Nanoplata

Las nanopartículas de plata (1 – 100nm) tienen propiedades ópticas, electrónicas y antibacterianas únicas y son ampliamente utilizadas en áreas tales como fotónica, electrónica, medicina, industria textil y en aplicaciones antimicrobianas en laboratorio (Oldenburg, 2016).

2.9.1 Usos de la nanoplata

Las nanopartículas de plata se utilizan en numerosas tecnologías y se incorporan en una amplia gama de productos de consumo que aprovechan sus propiedades ópticas, conductivas y antimicrobianas.

Aplicaciones diagnósticas: Las nanopartículas de plata se utilizan en biosensores y numerosos ensayos en los que éstas se pueden utilizar como etiquetas biológicas para la detección cuantitativa.

Aplicaciones antibacterianas: Las nanopartículas de plata se incorporan en prendas de vestir, calzado, pinturas, vendajes para heridas, electrodomésticos, cosméticos y plásticos. En el caso de laboratorio, en medio de cultivo *in vitro* por sus propiedades antimicrobianas.

Aplicaciones Conductivas: Las nanopartículas de plata se utilizan en tintas conductoras e integradas en compuestos para mejorar la conductividad térmica y eléctrica.

Aplicaciones ópticas: Las nanopartículas de plata se utilizan para la recolección eficiente de luz y para espectroscopías ópticas mejoradas, incluyendo fluorescencia potenciada por metal (MEF) (Oldenburg, 2016).

2.10 AgROVIT

Es un producto formulado con nanopartículas de plata (NPsAg) para el uso en el cultivo de tejidos vegetales; las NPsAg son empleadas para desinfección de explantes, para inhibir efectos de etileno en algunas especies, así como para la esterilización de medios de cultivo y la eliminación de virus *in vitro* (AgROVIT CP, 2014).

AgROVIT presenta un efecto microbicida en explantes de caña de azúcar, stevia, vainilla y banano, lo que representa una disminución de gastos de operación, vitroplantas sanas y la reducción de pérdidas por contaminación (AgROVIT CP, 2014).

2.10.1 Caracterización de las nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata consisten en una solución de AgNPs esféricas que miden 35 ± 15 nm de tamaño, que es plata agrupada (12 mg / mL de plata metálica funcional) con 188 mg / ml de polivinilpirrolidona (PVP, 10-30 kD) en agua con una concentración global de 20% de AgNPs (200 mg / ml). El tamaño de AgNPs metálicos se calcula usando un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución JEOL. El diámetro hidrodinámico, que está compuesto de AgNPs metálicos y ligados de PVP, las cuales son medidas en suspensión. Las impurezas de las AgNPs son α -pirrolidona $\leq 0,6\%$, *N*-vinilpirrolidona $\leq 0,04\%$, aldehídos $\leq 0,04\%$ y peróxidos $\leq 0,008\%$.

Con respecto a la condición de agregación, el exceso de ligandos de PVP y el potencial equivalen a 15 mV. La caducidad de las nanopartículas de plata es de 2 años (Bello, y otros, 2017).

2.11 Efecto hormético u hórmesis

La hórmesis es definida en el campo de la toxicología, como un fenómeno en el que un tóxico o una sustancia dañina, en cantidad pequeña, produce efectos estimulantes en organismos como las plantas. Numerosos ejemplos de respuestas de dosis de tipo hormético se observan en una amplia variedad de sub disciplinas biológicas, incluyendo farmacología, inmunología, medicina y biotecnología vegetal. Los procesos en cada una de estas disciplinas muestran respuestas de dosis horméticas con características cuantitativas similares, es decir, plasticidad similar, rejuvenecimiento de células, control de células tumorales, desarrollo foliar y radicular en plantas, en otras palabras, se consigue potenciación, sinergia y aditividad dentro de las características cuantitativas de la respuesta hormética en el organismo (Calabrese, 2008).

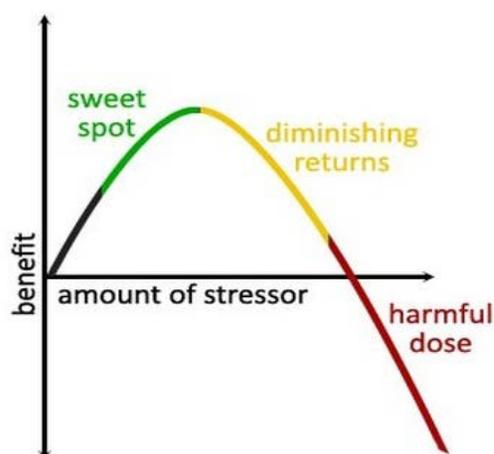


Figura 8 Curva del efecto hormético

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Ubicación del lugar de investigación

3.1.1 Ubicación política

El laboratorio de fisiología vegetal se encuentra localizado en las instalaciones de la Hacienda El Prado –IASA I, Parroquia Selva Alegre, Cantón Rumiñahui, Provincia de Pichincha.

3.1.2 Ubicación geográfica

La investigación se realizó en el laboratorio de fisiología vegetal de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria; las coordenadas se presentan a continuación:

Altitud: 2748m

Latitud: 0° 23' 20" S

Longitud: 78° 24' 44" E

Fuente: Estación Meteorológica IASA, 2012.

3.1.3 Condiciones de laboratorio

El cuarto de crecimiento donde se colocaron las plantas *in vitro*, presentó las siguientes condiciones: temperatura promedio 22⁰ C, humedad relativa del 62% y luz PAR (photon active reaction) de 14,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.2 Materiales

3.2.1 Varios

Planta madre (mora de Castilla), jabón líquido, agua destilada estéril (ADE), papel aluminio y plástico adhesivo.

3.2.2 Insumos de laboratorio

Vasos de precipitación, recipientes plásticos de 60 ml, micropipetas, matraces Erlenmeyer, botellas taradas, probetas y balones aforados.

3.2.3 Reactivos

Benomyl, agar agar, soluciones stocks nitratos, ioduros, fosfatos, sulfatos y edta, BAP, AIA, glicina, ácido nicotínico, inositol, piridoxina, tiamina, AgROVIT - CPrE (AgNP₃), hipoclorito de sodio 0.8%

3.2.4 Equipos

Microondas, cámara de flujo laminar, balanza analítica, cámara fotográfica, autoclave y pHmetro.

3.3 Métodos

3.3.1 Determinación del efecto antimicrobiano de cuatro dosis de nanoplata en medio MS en la fase de introducción *in vitro* en mora de castilla (*Rubus glaucus*).

En esta fase se evaluaron las dosis de nanoplata (0 mg.L⁻¹, 25 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹, 75 mg.L⁻¹, 100 mg.L⁻¹) en un medio Murashige y Skoog (MS)(1962) al 50% de concentración de sus sales y vitaminas, suplementado con 0,5 mg.L⁻¹ de bencil amino purina (BAP), 0,1 mg.L⁻¹ de ácido indol acético (AIA), 15 g.L⁻¹ de sacarosa ajustados a un pH de 5,8 y autoclavado a 121⁰C, 0,1 MPa durante 15 minutos.

3.3.1.1 Diseño experimental

3.3.1.1.1 Factores a probar

El factor que se probó, fueron las dosis de nanoplata (Tabla 1).

Tabla 1

Niveles de adición de nanoplata en el medio de cultivo en la fase de introducción

Nº de tratamientos	Nomenclatura	Descripción
T1	M0	Medio sin nanoplata
T2	M25	Medio con 25 mg.L ⁻¹ de nanoplata
T3	M50	Medio con 50 mg.L ⁻¹ de nanoplata
T4	M75	Medio con 75 mg.L ⁻¹ de nanoplata
T5	M100	Medio con 100 mg.L ⁻¹ de nanoplata

3.3.1.1.2 Tratamientos a comparar

Los tratamientos que se compararon son los niveles del factor (Dosis de nanoplata en el medio de cultivo, MO = 0 mg.L⁻¹, M25 = 25 mg.L⁻¹, M50 = 50 mg.L⁻¹, M75 = 75 mg.L⁻¹, M100 = 100 mg.L⁻¹).

3.3.1.1.3 Tipo de diseño

El ensayo para pruebas de laboratorio en micropropagación se dispuso bajo un diseño completamente al azar, con cinco tratamientos y cinco repeticiones bajo el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij}$$

μ	Corresponde a la media general
τ_j	El efecto del j-ésimo tratamiento
ε_{ij}	Error experimental

Tabla 2

Esquema del análisis de Varianza (ANAVA) de la fase de introducción in vitro en mora de castilla (R. glaucus)

F. de v.	g. l.
Tratamientos	4
Error	20
Total	24

F. de v.	Fuentes de variación
g.l.	Grados de libertad

3.3.1.1.4 Repeticiones o bloques

Se manejaron cinco repeticiones por cada tratamiento.

3.3.1.1.5 Características de las unidades experimentales

La unidad experimental fue un envase plástico de 6 cm de altura y 7,5 cm de ancho, con una microestaca de mora de castilla, con cinco unidades experimentales, con un total de veinticinco envases.

3.3.1.1.6 Croquis experimental

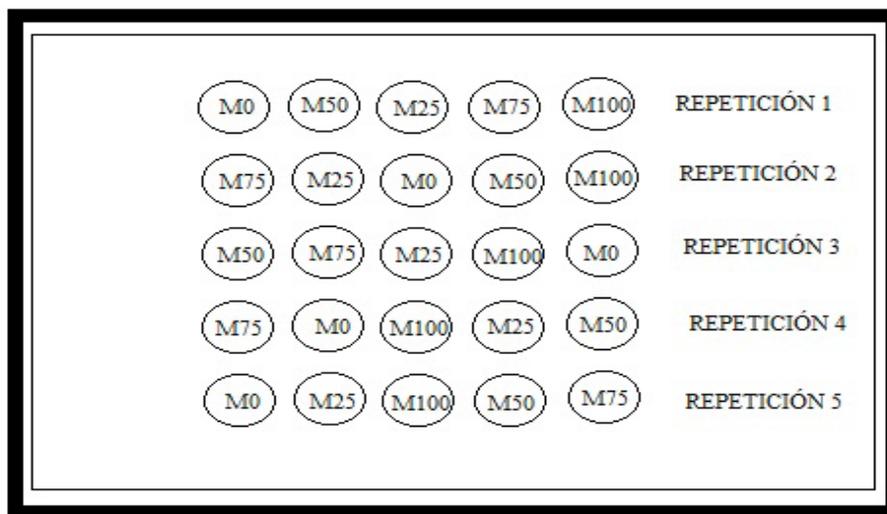


Figura 9 Distribución de tratamientos en la fase de introducción

M0	Testigo 0 mg.L ⁻¹ de nanoplata en medio de cultivo.
M25	Tratamiento con dosis de nanoplata de 25 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.
M50	Tratamiento con dosis de nanoplata de 50 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.
M75	Tratamiento con dosis de nanoplata de 75 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.
M100	Tratamiento con dosis de nanoplata de 100 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.

3.3.1.1.7 Análisis estadístico

Se utilizó el paquete informático INFOSTAT, con el que se realizaron las siguientes pruebas: LSD FISHER al 5% para tratamientos en general y para comparar el efecto de las diferentes dosis de nanoplata sobre el efecto bioestimulante y antimicrobiano.

El C. V. (Coeficiente de variación) se lo calculó con la siguiente fórmula:

$$C_V = \frac{\sigma}{|\bar{x}|}$$

σ = desviación típica
 \bar{x} = media

3.3.1.1.8 Mediciones experimentales en la fase de introducción *in vitro* en mora de castilla.

Las variables de estudio en la presente investigación, fueron porcentaje y presencia de la contaminación en el medio de cultivo; porcentaje y presencia de fenoles en el medio de cultivo; número de brotes, altura del brote y número de hojas. Cada variable fue medida 20 días después de la siembra.

3.3.1.1.8.1 Porcentaje y presencia de contaminación *in vitro*

El porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica se evaluó en el número de envases afectados por microorganismos, aplicando la siguiente fórmula:

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

Para medir el grado de presencia de contaminación *in vitro* se midió el área mediante papel milimetrado. Se empleó la siguiente escala acorde al área del envase (27 cm²) con medio de cultivo:

Tabla 3
Escala de medición del grado de contaminación en la fase de introducción in vitro de mora de castilla

Simbología	Área del envase (cm2)	Porcentaje (%)
+	0,1 – 9	0,1 - 33
++	9 – 18	33 - 66
+++	18 – 27	66 – 100
-	Ausencia de contaminación	

3.3.1.1.8.2 Porcentaje y presencia de fenoles en el medio de cultivo

El porcentaje de fenolización fue medido mediante el número de envases que cambian el color del medio de cultivo, de transparente a azul oscuro - morado, aplicando la siguiente fórmula:

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

Para medir el grado de presencia de fenoles *in vitro* se midió el área mediante papel milimetrado. Se empleó la siguiente escala acorde al área del envase (27 cm²) con medio de cultivo:

Tabla 4
Escala de medición del grado de fenolización en la fase de introducción in vitro de mora de castilla

Simbología	Área del envase (cm2)	Porcentaje (%)
+	0,1 – 9	0,1 - 33
++	9 – 18	33 - 66
+++	18 – 27	66 - 100
-	Ausencia de fenoles	

3.3.1.1.8.3 Número de brotes

Para esta variable se contaron los brotes desarrollados de la yema axilar observados 20 días después de la siembra.

3.3.1.1.8.4 Altura del brote y número de hojas

Se midió el crecimiento de los brotes que parten de la yema del explante, tomando en cuenta la altura (cm) y el número de folíolos desarrollados, medidos a los 20 días después de la siembra.

3.3.1.1.9 Métodos específicos del experimento en la fase de *introducción in vitro* en mora de castilla (*R. glaucus*).

3.3.1.1.9.1 Obtención del material vegetal (explantes)

El material de *Rubus glaucus* (Benth) se recolectó de la colección de frutales de la Carrera de Ciencias Agropecuarias E.S.P.E. Estas plantas están manejadas en un sistema de espaldera y una densidad de plantación de 0,30 m entre planta y 1 m entre hilera, con un riego de dos veces semanales. Luego, se cortaron varetas vegetativas de 25 cm de largo (Vaca , 2012), éstas fueron trasladadas a el laboratorio en papel periódico.



Figura 10 Cultivo de mora de castilla, colección frutales IASA

3.3.1.1.9.2 Desinfección del material vegetativo pre cámara

Se procedió en tinajas de gran volumen a la limpieza de los explantes con agua + jabón antibacterial con un cepillo o esponja que no afecte a la integridad de los mismos. Con agua destilada, se realizó un lavado con jabón antibacterial por diez minutos y se procedió a enjuagar. Se pesaron 6g de benomyl (fungicida) y se colocaron los explantes en 1 litro de agua destilada durante una hora y luego se enjuagaron (Vaca , 2012).



Figura 11 Desinfección pre cámara con varetas de mora de castilla

3.3.1.1.9.3 Desinfección del material vegetativo en la cámara de flujo laminar.

Se procedió dentro de la cámara de flujo laminar a realizar una desinfección con hipoclorito de sodio al 0,8% por 10 minutos con agitación, una vez culminado el tiempo, se realizó tres enjuagues con agua destilada estéril (ADE) durante 10 minutos.



Figura 12 Microestacas desinfectadas dentro de la cámara de flujo laminar

3.3.1.1.9.4 Desarrollo de la fase de introducción con explantes de mora de castilla (*R. glaucus*).

Para la fase de introducción el medio de cultivo utilizado fue al 50% concentración de medio Murashige y Skoog (1962), suplementado con bencil amino purina ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) y ácido indol acético ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$), un pH de 5.8, 15 g.L^{-1} de sacarosa y 0,6 % de agar agar y se aforó a 1000 mL con ADE. Por cada tratamiento, se prepararon en matraces de 250 mL de medio de cultivo y fueron autoclavados a $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 0,1 MPa por 15 minutos. Transcurrido el proceso de

autoclave se dejó enfriar en la cámara de flujo laminar a 75- 80 °C y se colocó la nanoplata. Se dispensó 20 mL de medio MS en cada envase plástico. Donde fueron sembrados los explantes. Posteriormente, se colocaron los explantes sembrados en un cuarto de crecimiento con luz blanca de 60 watts, luz PAR de 14,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a 22°C durante 20 días.

3.3.2 Evaluación del efecto hormético de cuatro dosis de nanoplata en la fase de multiplicación *in vitro* en mora de castilla (*Rubus glaucus*).

En esta fase se evaluó las dosis de nanoplata (0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 75 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en un medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) al 50% de concentración de sus sales y vitaminas; suplementado con 0,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de bencil amino purina (BAP), 0,1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido indol acético (AIA), 15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa, 0,6% de agar agar ajustados a un pH de 5.8 y autoclavado a 121°C, 0,1 MPa durante 15 minutos.

3.3.2.1 Diseño experimental

3.3.2.1.1 Factores a probar

El factor que se probó, fueron las dosis de nanoplata (Tabla 5).

Tabla 5

Niveles de adición de nanoplata al medio de cultivo en la fase de multiplicación in vitro de mora de castilla

Nº de tratamientos	Nomenclatura	Descripción
T1	M0	Medio sin nanoplata
T2	M25	Medio con 25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de nanoplata
T3	M50	Medio con 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de nanoplata
T4	M75	Medio con 75 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de nanoplata
T5	M100	Medio con 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de nanoplata

3.3.2.1.2 Tratamientos a comparar

Los tratamientos que se compararon, fueron los niveles del factor (Dosis de nanoplata en el medio de cultivo, MO = 0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, M25 = 25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, M50 = 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, M75 = 75 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, M100 = 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

3.3.2.1.3 Tipo de diseño

El ensayo para pruebas de laboratorio en micropropagación, se dispuso bajo un diseño completamente al azar, con cinco tratamientos y cinco repeticiones bajo el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij}$$

μ = Corresponde a la media general
 τ_j = El efecto del j-ésimo tratamiento
 ε_{ij} = Error experimental

Tabla 6
Esquema del análisis de Varianza (ANAVA)
en la fase de multiplicación in vitro en mora
de castilla (*R. glaucus*)

F. de v.	g.l.
Tratamientos	4
Error	20
Total	24

F. de v. Fuentes de variación
g.l. Grados de libertad

3.3.2.1.4 Repeticiones o bloques

Se manejaron cinco repeticiones por cada tratamiento.

3.3.2.1.5 Características de las unidades experimentales

La unidad experimental fue un envase plástico de 6 cm de altura y 7,5 cm de ancho, con un brote de mora de castilla, con cinco de unidades experimentales, con un total de veinticinco envases.

3.3.2.1.6 Croquis experimental

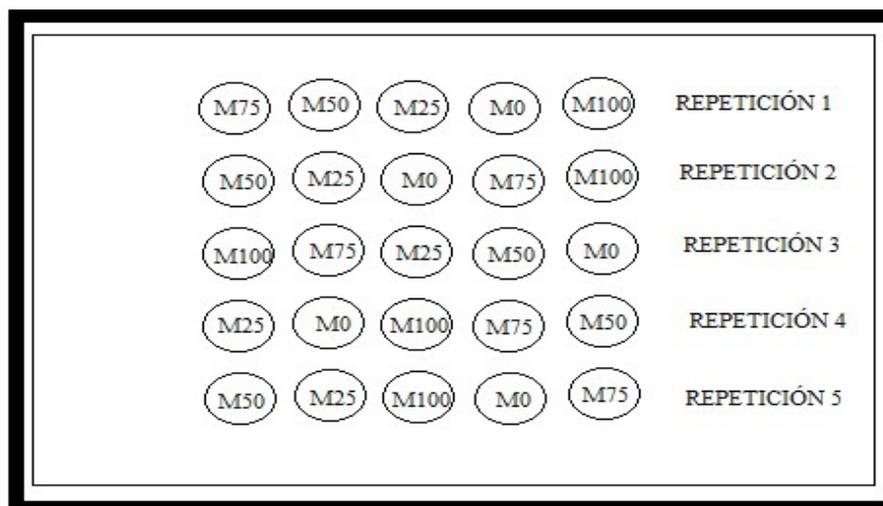


Figura 13 Distribución de tratamientos en la fase de multiplicación

M0	Testigo 0 mg.L ⁻¹ de nanoplata en medio de cultivo.
M25	Tratamiento con dosis de nanoplata de 25 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.
M50	Tratamiento con dosis de nanoplata de 50 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.
M75	Tratamiento con dosis de nanoplata de 75 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.
M100	Tratamiento con dosis de nanoplata de 100 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.

3.3.2.1.7 Análisis estadístico

Se utilizó el paquete informático INFOSTAT, con el que se realizó la siguiente prueba: LSD FISHER al 5% para tratamientos en general y para comparar el efecto de las diferentes dosis de nanoplata sobre el efecto bioestimulante y antimicrobiano.

El C. V. (Coeficiente de variación) se lo calculó con la siguiente fórmula:

$$C_V = \frac{\sigma}{|\bar{x}|}$$

σ = desviación típica
 \bar{x} = media

3.3.2.1.8 Mediciones experimentales en la fase de multiplicación *in vitro* de mora de castilla.

Las variables de estudio en la presente investigación, fueron altura del brote (cm) y número de hojas, número de brotes, porcentaje y presencia de contaminación en medio de cultivo de multiplicación, porcentaje y presencia de fenoles y clorofila (A, B y total). Cada variable fue medida a los 90 días después de la siembra.

3.3.2.1.8.1 Número de brotes

Para esta variable se contó el número de brotes desarrollados en los cultivos.

3.3.2.1.8.2 Altura de brotes y número de hojas

Se observó y se midió el crecimiento de la yema del explante tomando en cuenta la altura (cm) y el número de foliolos desarrollados y medidos a los 90 días.

3.3.2.1.8.3 Porcentaje y presencia de contaminación *in vitro*

El porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica, se evaluó el número de envases afectados por microorganismos; aplicando la siguiente fórmula:

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

Para medir el grado de presencia de contaminación *in vitro* se midió el área mediante papel milimetrado. Se empleó la siguiente escala acorde al área del envase (27 cm²) con medio de cultivo:

Tabla 7
Escala de medición del grado de contaminación en la fase de multiplicación in vitro de mora de castilla

Simbología	Área del envase (cm ²)	Porcentaje (%)
+	0,1 – 9	0,1 – 33
++	9 – 18	33 – 66
+++	18 – 27	66 – 100
-	Ausencia de contaminación	

3.3.2.1.8.4 Porcentaje y presencia de fenoles en el medio de cultivo

El porcentaje de fenolización fue medido mediante el número de envases que cambian el color del medio de cultivo, de transparente a azul oscuro - morado, aplicando la siguiente fórmula:

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

Para medir el grado de presencia de fenoles *in vitro* se midió el área mediante papel milimetrado. Se empleó la siguiente escala acorde al área del envase (27 cm²) con medio de cultivo:

Tabla 8
Escala de medición del grado de fenolización en la fase de multiplicación in vitro de mora de castilla

Simbología	Área del envase (cm ²)	Porcentaje (%)
+	0,1 – 9	0,1 – 33
++	9 – 18	33 – 66
+++	18 – 27	66 – 100
-	Ausencia de fenoles	

3.3.2.1.8.5 Clorofila A, B y Total

La medición de clorofila se realizó en un espectrofotómetro (spectroFlex 6600) a 664 nm y 649 nm y se aplicó las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila A} = 13,36 (\text{Abs}664) - 5,19(\text{Abs}649)$$

$$\text{Clorofila B} = 27,43(\text{Abs}649) - 8,12 (\text{Abs}664)$$

$$\text{Clorofila Total} = \text{Clorofila A} + \text{Clorofila B}$$

(Sumanta, Haque, Nishika, & Suprakash, 2014)

3.3.2.1.9 Métodos específicos del experimento en la fase de multiplicación in vitro de mora de castilla (*R. glaucus*).

3.3.2.1.9.1 Medio de cultivo para la fase de multiplicación

Para esta fase se utilizó medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) descrito en la etapa de introducción, suplementando la dosis de BAP a 0,75 mg.L⁻¹ y AIA a 0,3 mg.L⁻¹, 0.6% de agar agar, vitaminas.

Por cada tratamiento, se prepararon en matraces de 250 mL de medio de cultivo y fueron autoclavados a 121 °C, 0,1 MPa por 15 minutos. Transcurrido el proceso de autoclave se dejó enfriar en la cámara de flujo laminar a 75- 80 °C y se colocó la nanoplata. Se dispensó 20 mL de medio MS en cada envase plástico. Donde fueron sembrados los brotes. Posteriormente, se colocaron los explantes sembrados en un cuarto de crecimiento con luz blanca de 60 watts, Luz PAR de 14,6 μmol.m⁻².s⁻¹ a 22°C durante 90 días.

3.3.2.1.9.2 Desarrollo de la fase de multiplicación *in vitro* con brotes de mora de castilla (*R. glaucus*).

Para la fase de multiplicación se utilizaron brotes previamente desarrollados en la fase de introducción y se realizó una selección de homogeneidad (altura 1 cm y desarrollo foliar 4 a 5 hojas). Los brotes se separaron de la microestaca y se los sembró en el medio de cultivo, posteriormente se colocaron los cultivos en un cuarto de crecimiento provisto de lámparas de luz blanca de 60 watts a 22°C durante 90 días.

3.3.3 Determinación del efecto hormético sobre el sistema radicular de cuatro dosis de nanoplata, en la fase de enraizamiento en vitroplantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*).

Para la evaluación del efecto hormético se estimaron las dosis de nanoplata (0 mg.L⁻¹, 25 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹, 75 mg.L⁻¹, 100 mg.L⁻¹) en un medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) al 50% de concentración de sus sales y vitaminas, suplementado con 0,5 mg.L⁻¹ de bencil amino purina (BAP), 0,2 mg.L⁻¹ de ácido indol acético (AIA), 0,5 mg.L⁻¹ ácido indol butírico (IBA), 15 g.L⁻¹ de sacarosa ajustados a un pH de 5,8 y autoclavado a 121⁰C, 0,1 MPa durante 15 minutos.

3.3.3.1 Diseño experimental

3.3.3.1.1 Factores a probar

El factor que se probó fueron las dosis de nanoplata (Tabla 9).

Tabla 9

Niveles de adición de nanoplata al medio de cultivo en la fase de enraizamiento in vitro de mora de castilla

Nº de tratamientos	Nomenclatura	Descripción
T1	M0	Medio sin nanoplata
T2	M25	Medio con 25 mg.L ⁻¹ de nanoplata
T3	M50	Medio con 50 mg.L ⁻¹ de nanoplata
T4	M75	Medio con 75 mg.L ⁻¹ de nanoplata
T5	M100	Medio con 100 mg.L ⁻¹ de nanoplata

3.3.3.1.2 Tratamientos a comparar

Los tratamientos que se compararon son los niveles del factor (Dosis de nanoplata en el medio de cultivo, MO = 0 mg.L⁻¹, M25 = 25 mg.L⁻¹, M50 = 50 mg.L⁻¹, M75 = 75 mg.L⁻¹, M100 = 100 mg.L⁻¹).

3.3.3.1.3 Tipo de diseño

El ensayo para pruebas de laboratorio en micropropagación se dispuso bajo un diseño completamente al azar, con cinco tratamientos y cinco repeticiones, bajo el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij}$$

μ = Corresponde a la media general

τ_j = El efecto del j-ésimo tratamiento

ε_{ij} = Error experimental

Tabla 10

Esquema del análisis de varianza (ANAVA) en la fase de enraizamiento in vitro en mora de castilla (R. glaucus)

F. de v.	g.l.
Tratamientos	4
Error	20
Total	24

F. de v.
g.l.

Fuentes de variación
Grados de libertad

3.3.3.1.4 Repeticiones o bloques

Se manejaron cinco repeticiones por cada tratamiento

3.3.3.1.5 Características de las unidades experimentales

La unidad experimental fue un envase plástico de 9 cm de altura y 7,5 cm de ancho, con un brote de mora de castilla, con cinco unidades experimentales, dando un total de veinticinco envases.

3.3.3.1.6 Croquis experimental

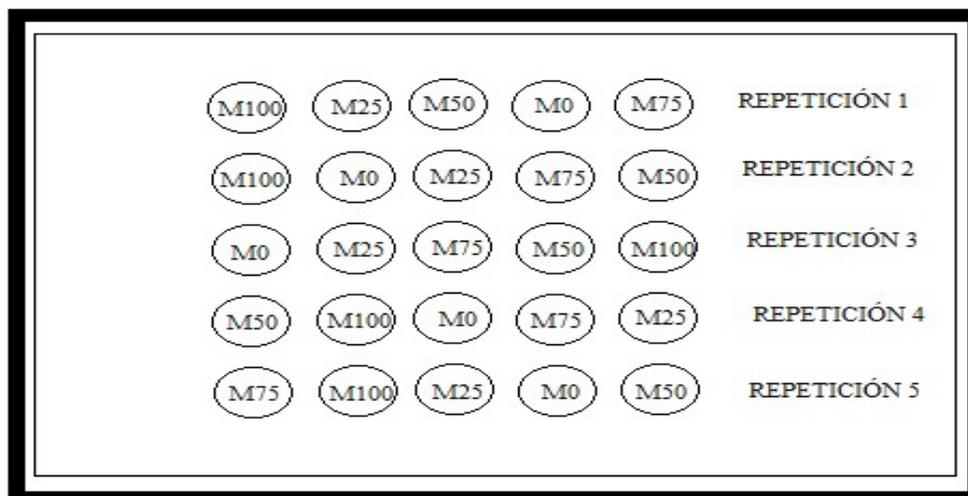


Figura 14 Distribución de tratamientos en la fase de enraizamiento

M0	Testigo 0 mg.L ⁻¹ de nanoplata en medio de cultivo.
M25	Tratamiento con dosis de nanoplata de 25 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.
M50	Tratamiento con dosis de nanoplata de 50 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.
M75	Tratamiento con dosis de nanoplata de 75 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.
M100	Tratamiento con dosis de nanoplata de 100 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.

3.3.3.1.7 Análisis estadístico

Se utilizó el paquete informático INFOSTAT, con el que se realizaron las siguientes pruebas: LSD FISHER al 5% para tratamientos en general y para comparar el efecto de las diferentes dosis de nanoplata sobre el efecto bioestimulante en el sistema radicular y antimicrobiano.

El C. V. (Coeficiente de variación) se lo calculó con la siguiente formula:

$$C_V = \frac{\sigma}{|\bar{x}|}$$

σ = desviación típica
 \bar{x} = media

3.3.3.1.8 Mediciones experimentales en la fase de enraizamiento *in vitro* de mora de castilla

Las variables objeto de estudio en la presente investigación, fueron altura de la vitroplanta (cm) y número de hojas, número de raíces, porcentaje de enraizamiento del tratamiento, clorofila A, B y total, porcentaje de contaminación en medio de cultivo, y, porcentaje y presencia de fenoles. Cada variable fue medida a los 45 días después de la siembra.

3.3.3.1.8.1 Altura de la vitroplanta (cm) y número de hojas

Se midió el crecimiento de la vitroplanta tomando en cuenta la altura (cm) y el número de foliolos desarrollados medidos a los 45 días.

3.3.3.1.8.2 Número de raíces de raíces desarrolladas

Se observó el desarrollo de raíces a los 45 días, cuando se realizó un conteo de esta variable.

3.3.3.1.8.3 Porcentaje de enraizamiento del tratamiento

El porcentaje de enraizamiento se lo obtuvo mediante la fórmula que permite medir el efecto de la nanoplata en los tratamientos respecto al desarrollo normal de la vitroplanta (testigo – sin nanoplata):

$$\text{porcentaje de enraizamiento} = \frac{(\# \text{ de individuos ET} - \# \text{ de individuos Et})}{\text{número total de individuos del tratamiento}} \times 100$$

de individuos ET= número de individuos enraizados del tratamiento

de individuos Et= número de individuos enraizados del testigo

3.3.3.1.8.4 Clorofila A, B y Total

La medición de clorofila se realizó en un espectrofotómetro (spectroFlex 6600) a 664 nm y 649 nm y se aplicó las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila A} = 13,36 (\text{Abs}664) - 5,19(\text{Abs}649)$$

$$\text{Clorofila B} = 27,43(\text{Abs}649) - 8,12 (\text{Abs}664)$$

$$\text{Clorofila Total} = \text{Clorofila A} + \text{Clorofila B}$$

(Sumanta *et al.*, 2014)

3.3.3.1.8.5 Porcentaje y presencia de contaminación *in vitro*

El porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica, se evaluó el número de envases afectados por microorganismos, aplicando la siguiente fórmula:

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

Para medir el grado de presencia de contaminación *in vitro* se midió el área mediante papel milimetrado. Se empleó la siguiente escala acorde al área del envase (27 cm²) con medio de cultivo:

Tabla 11

Escala de medición del grado de contaminación en la fase de enraizamiento in vitro de mora de castilla

Simbología	Área del envase (cm ²)	Porcentaje (%)
+	0,1 – 9	0,1 – 33
++	9 – 18	33 – 66
+++	18 – 27	66 – 100
-	Ausencia de contaminación	

3.3.3.1.8.6 Porcentaje y presencia de fenoles en el medio de cultivo

El porcentaje de fenolización fue medido mediante el número de envases que cambian el color del medio de cultivo, de transparente a azul oscuro - morado, aplicando la siguiente fórmula:

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

Para medir el grado de presencia de fenoles *in vitro* se midió el área mediante papel milimetrado. Se empleó la siguiente escala acorde al área del envase (27 cm²) con medio de cultivo:

Tabla 12

Escala de medición del grado de fenolización en la fase de enraizamiento in vitro de mora de castilla

Simbología	Área del envase (cm ²)	Porcentaje (%)
+	0,1 – 9	0,1 - 33
++	9 – 18	33 - 66
+++	18 – 27	66 - 100
-	Ausencia de fenoles	

3.3.3.1.9 Métodos específicos del experimento en la fase de enraizamiento in vitro de mora de castilla (*R. glaucus*).

3.3.3.1.9.1 Medio de cultivo

Para esta fase se utilizó medio de cultivo líquido Murashige y Skoog, al 50% de concentración de sales y vitaminas, con una variación en el BAP 0,5 mg.L⁻¹, AIA 0,2 mg.L⁻¹ e IBA 0,5 mg.L⁻¹, sin agar, suplementado vitaminas.

Por cada tratamiento, se prepararon en matraces de 250 mL de medio de cultivo y fueron autoclavados a 121 °C, 0,1 MPa por 15 minutos. Transcurrido el proceso de autoclave se dejó enfriar en la cámara de flujo laminar a 75- 80 °C y se colocó la nanoplata. Se dispensó 6 mL de medio MS en cada envase plástico. Donde fueron sembrados los brotes. Posteriormente, se colocaron los explantes sembrados en un cuarto de crecimiento con luz blanca de 60 watts, luz PAR de 14,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a 22°C durante 45 días

3.3.3.1.9.2 Desarrollo de la fase de enraizamiento con brotes de mora de castilla (*R. glaucus*).

Para el enraizamiento se seleccionaron los brotes provenientes de la fase de multiplicación, mediante su homogeneidad (altura 1 cm y desarrollo foliar 4 a 5 hojas) y fueron sembrados en el medio de cultivo líquido; posteriormente se colocaron los cultivos en un cuarto de crecimiento provisto de lámparas de luz blanca de 60 watts, luz PAR de 14,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a 22°C durante 45 días.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación de diferentes dosis de nanoplata en la regeneración *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus*) para determinar el efecto antimicrobiano en el medio de cultivo.

La contaminación en la fase de introducción (Tabla 13), fue evaluada a los 20 días después de la siembra *in vitro*, la nanoplata tuvo un efecto positivo en la inhibición del desarrollo de microorganismos en el medio de cultivo. En los tratamientos M50, M75 y M100 con dosis de nanoplata (50, 75 y 100 mg.L⁻¹ de medio de cultivo) no se registró contaminación con microorganismos. Mientras tanto, en el testigo se registró contaminación bacteriana del 80%, con un crecimiento microbiano en el medio nutritivo mayor a 18 cm² y con el tratamiento M25 (25 mg.L⁻¹ de medio de cultivo de nanoplata) se evidenció una contaminación bacteriana del 40%, con un área de crecimiento de microorganismos menor a 18 cm² en el envase.

La contaminación en la fase de multiplicación (Tabla 13), fue evaluada a los 90 días después del trasplante de los brotes al medio de cultivo de multiplicación, en donde se evidenció que los tratamientos M50, M75 y M100 (con dosis de nanoplata 50, 75 y 100 mg.L⁻¹ de medio de cultivo) inhibieron el desarrollo de microorganismos. Mientras tanto, en el tratamiento M25 (25 mg.L⁻¹ de medio de cultivo de nanoplata), se registró el 20% de contaminación bacteriana y en el testigo M0, se determinó el 66% de contaminación bacteriana.

La contaminación en la fase de enraizamiento (medio nutritivo líquido) (Tabla 13), fue evaluada a los 45 días después del trasplante de los brotes a partir de la fase de multiplicación. Los tratamientos, que no registró contaminación fueron M50, M75 y M100; a diferencia del testigo M0 que presentó un 40% de envases contaminados con bacterias y el tratamiento M25 (25 mg.L⁻¹ de medio de cultivo de nanoplata) con un 20% de envases afectados con microorganismos con una presencia de hasta 9 cm² y 18 cm² respectivamente.

Tabla 13

Porcentaje y presencia de contaminación del medio de cultivo en la regeneración *in vitro* de mora de castilla (*R. glaucus*)

Tratamiento (mg de nanoplata.L ⁻¹ de medio de cultivo MS)	Fase de Introducción		Fase de multiplicación		Fase de enraizamiento	
	Porcentaje de contaminación (%)	Presencia	Porcentaje de contaminación (%)	Presencia	Porcentaje de contaminación (%)	Presencia
M0 (0)	80	+++	60	++	40	++
M25 (25)	40	++	20	+	20	+
M50 (50)	0	-	0	-	0	-
M75 (75)	0	-	0	-	0	-
M100 (100)	0	-	0	-	0	-

Contaminación en el medio de cultivo

+	0,1 – 9 cm ² (0,1% – 33% del área del envase con medio de cultivo)
++	9 – 18 cm ² (33% – 66% del área del envase con medio de cultivo)
+++	18 – a más cm ² (66% – 100% del área del envase con medio de cultivo)
-	ausencia de contaminación

La contaminación endógena o bacteriana persiste en las tres fases del estudio, en los tratamientos M0 y M25, debido a que la bacteria endófitas se encuentra tanto en el floema y xilema de la microestaca, lo que en la fase de introducción es muy alto el riesgo de contaminación, mientras en la fase de multiplicación, al realizar el corte de separación, se deja una parte de la microestaca con el brote, el cual es sembrado en un nuevo medio nutritivo y en la fase de enraizamiento al separar el brote posee una parte original de la microestaca.

(Spinoso, y otros, 2017) en estudios de regeneración *in vitro* en vainilla (*Vanilla planifolia*) a dosis de 50, 100 y 200 mg.L⁻¹ de nanoplata no registró contaminación con microorganismos, mientras que a una dosis de 0 y 25 mg.L⁻¹ de nanoplata, determinaron un 8,33% y 16,66% de contaminación del medio de cultivo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la presente investigación.

Según el estudio realizado por (Cancino, Quevedo, Villamizar, & Díaz, 2015) al evaluar el efecto de dos tratamientos de desinfección superficial en mora de castilla; T1 (Isodine 2% por 10 minutos, fungicida Mertec 0,4% por 30 minutos y alcohol 70% por 30 segundos) y T2 (Isodine 2% por 10 minutos, fungicida Mertec 0,4% por 60 minutos y alcohol 70% por 60 segundos), registró una contaminación de 49,7% en el tratamiento T1 y de 16,5% de contaminación en el

tratamiento T2, lo señalado coincide en el estudio que el uso de nanoplata es más eficiente que la desinfección tradicional.

4.2 Evaluación de diferentes dosis de nanoplata en la regeneración *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus*) para determinar el efecto en la fenolización en el medio de cultivo.

Con relación a la fenolización, en la fase de introducción, fue evaluada a los 20 días después de la siembra *in vitro*, (Tabla 14) se evidenció una inhibición de fenoles en el medio de cultivo en los tratamientos M50, M75 y M100 con dosis de nanoplata (50, 75 y 100 mg.L⁻¹ de medio de cultivo). A diferencia del testigo se evidenció fenoles del 100% en los envases evaluados, con un halo en el medio nutritivo mayor a 18 cm² y también en el tratamiento M25 (25 mg.L⁻¹ de medio de cultivo) mostró una fenolización del 40% de envases con un halo menor al 33% de la superficie del envase.

La fenolización en la fase de multiplicación (Tabla 14), fue evaluada a los 90 días después del trasplante de los brotes a medio de cultivo de multiplicación, en donde se evidenció que los tratamientos M50, M75 y M100 con dosis de nanoplata (50, 75 y 100 mg.L⁻¹ de medio de cultivo) no presentaron fenoles. Mientras que, el tratamiento M25 (25 mg.L⁻¹ de nanoplata en el medio de cultivo) presentó una fenolización del 20% de envases evaluados y en el testigo M0, se registró el 60% de fenoles en los envases.

La fenolización en la fase de enraizamiento (medio de cultivo líquido) (Tabla 14), fue evaluada a los 45 días después del trasplante de los brotes, provenientes de la fase de multiplicación. Los tratamientos que no presentaron fenolización, fueron M25, M50, M75 y M100 (25, 50, 75 y 100 mg.L⁻¹ de nanoplata en el medio de cultivo); mientras que, el testigo M0 presentó un 20% de fenolización.

Esta reducción de fenoles se debe a la composición de las nanopartículas de plata, ya que están formuladas en poli vinil pírrolidona (PVP), compuesto químico que actúa como adsorbente de fenoles (Bello, y otros, 2017).

Tabla 14

Porcentaje de fenolización en la regeneración *in vitro* de mora de castilla (*R. glaucus*) en el medio de cultivo

Tratamiento (mg de nanoplata.L ⁻¹ de medio de cultivo MS)	Fase de introducción	Fase de multiplicación	Fase de enraizamiento
	Porcentaje de fenolización (%)	Porcentaje de fenolización (%)	Porcentaje de fenolización (%)
M0 (0)	100	60	20
M25 (25)	40	20	0
M50 (50)	0	0	0
M75 (75)	0	0	0
M100 (100)	0	0	0

(Spinoso, y otros, 2017) comprobaron en la regeneración *in vitro* de Vainilla (*Vanilla planifolia*) dosis de 25 y 50 mg.L⁻¹ de nanoplata (Argovit) no detienen el desarrollo de fenoles totales.

(Cancino, Quevedo, Villamizar , & Díaz , 2015) al evaluar tratamientos de desinfección superficial en mora de castilla; T1 (Isodine 2% por 10 minutos, fungicida Mertec 0,4% por 30 minutos y alcohol 70% por 30 segundos) y T2 (Isodine 2% por 10 minutos, fungicida Mertec 0,4% por 60 minutos y alcohol 70% por 60 segundos), se obtuvo como resultados de una media de fenolización de 9,3% para el tratamiento T1 y 16,1% en el tratamiento T2, evidenciando que en esta investigación a dosis superiores de 50 mg de nanoplata no se obtiene fenolización.

Por otra parte, (Sigarroa & García , 2011) , analizaron el porcentaje de fenolización en el establecimiento y multiplicación *in vitro* de mora de castilla (*R. glaucus*), en el que se usaron medios nutritivos enriquecidos con hormonas adicionales y demostraron que los explantes también desarrollan fenolización, lo que hace énfasis que el uso de nanoplata, a dosis superiores de los 50 mg.L⁻¹ de medio de cultivo en la regeneración *in vitro* de mora de castilla, bloquea la aparición de fenoles en medios nutritivos.

4.3 Evaluación de diferentes dosis de nanoplata en la fase de multiplicación y enraizamiento *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus*) en la determinación del contenido de clorofila A, B y Total

La clorofila en la fase de multiplicación, fue evaluada trascurridos 90 días (Tabla 15) después del trasplante de los brotes al medio nutritivo de multiplicación. Se pudo determinar diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{4,20} = 9,55$; $p = 0,0002$). Los tratamientos M50, M75 y M100 presentaron los mayores contenidos de clorofila, destacándose el tratamiento M50 con $34,36 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de clorofila A, $27,53 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de clorofila B y $61,79 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de clorofila total, mientras que el testigo M0, obtuvo los contenidos más bajos de clorofila, con $23,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de clorofila A, $13,39 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de clorofila B y $36,53 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de clorofila total.

Tabla 15
Promedio \pm error estándar de las medias de clorofila según los tratamientos de nanoplata en la fase de multiplicación

Tratamiento	Clorofila A ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Clorofila B ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Clorofila Total ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
M0	$23,14 \pm 4,07$ a	$13,39 \pm 4,02$ a	$36,53 \pm 7,32$ a
M25	$26,13 \pm 6,94$ a	$16,66 \pm 12,42$ ab	$42,79 \pm 18,91$ a
M50	$34,26 \pm 0,84$ b	$27,53 \pm 5,83$ c	$61,79 \pm 6,56$ b
M75	$34,03 \pm 1,07$ b	$23,24 \pm 6,3$ abc	$57,53 \pm 7,04$ b
M100	$32,73 \pm 1,21$ b	$24,8 \pm 6,64$ bc	$57,53 \pm 6,91$ b

*medias con letra diferente son significativamente diferentes

M0	Testigo 0 mg.L ⁻¹ de nanoplata en medio de cultivo.
M25	Tratamiento con dosis de nanoplata de 25 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.
M50	Tratamiento con dosis de nanoplata de 50 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.
M75	Tratamiento con dosis de nanoplata de 75 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.
M100	Tratamiento con dosis de nanoplata de 100 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.

La clorofila en la fase de enraizamiento, fue evaluada trascurridos 45 días (Tabla 16) después del trasplante de los brotes al medio líquido. Se pudo determinar diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{4,20} = 23,75$; $p < 0,0001$). Los tratamientos M50, M75 Y M100 presentaron los mayores contenidos de clorofila, destacándose el tratamiento M50 con $35,89 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de clorofila A, $34,98 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de clorofila B y $70,86 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de clorofila total, mientras que el testigo M0, obtuvo los contenidos más bajos de clorofila, con $16,58 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de clorofila A, $10,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de clorofila B y $26,73 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de clorofila total.

Tabla 16

Promedio \pm error estándar de las medias de clorofila según los tratamientos de nanoplata en la fase de enraizamiento

Tratamiento	Clorofila A ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Clorofila B ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Clorofila Total ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
M0	16,58 \pm 3,1 a	10,15 \pm 3,15 a	26,73 \pm 3,98 a
M25	24,2 \pm 6,57 b	13,63 \pm 11,21 ab	37,83 \pm 16,06 a
M50	35,89 \pm 0,25 d	34,98 \pm 1,98 d	70,86 \pm 2,15 c
M75	31,02 \pm 3,44 c	20,87 \pm 7,8 bc	51,9 \pm 10,07 b
M100	34,34 \pm 1,57 cd	26,27 \pm 5,42 cd	60,62 \pm 6,59 bc

*medias con letra diferente son significativamente diferentes

M0	Testigo 0 mg.L ⁻¹ de nanoplata en medio de cultivo.
M25	Tratamiento con dosis de nanoplata de 25 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.
M50	Tratamiento con dosis de nanoplata de 50 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.
M75	Tratamiento con dosis de nanoplata de 75 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.
M100	Tratamiento con dosis de nanoplata de 100 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.

Por su parte, (Spinoso, y otros, 2017) determinaron que en vainilla, que a dosis de 50 mg.L⁻¹ de nanoplata (Argovit), se obtuvieron mayores contenidos de clorofila A (0,10 mg.mL⁻¹), de clorofila B (0, 11 mg.mL⁻¹) y de clorofila total (0,21 mg.mL⁻¹), mientras que en el testigo se registraron los menores contenidos de clorofila A, B y total, así mismo comparando los resultados del uso de AgROVIT la dosis que presenta mayores contenidos de clorofila es de 50 mg.L⁻¹ de nanoplata. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la presente investigación.

4.4 Evaluación de diferentes dosis de nanoplata en la fase de introducción *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus*) para el análisis del efecto hormético en el número de brotes, alturas de brotes y números de hojas.

El efecto hormético fue evaluado en la fase de introducción a los 20 días después de la siembra, donde se obtuvo diferencias significativas en número de brotes ($F_{4, 20} = 5,15$; $p=0,005$), altura del primer brote ($F_{4, 20} = 5,15$; $p=0,0051$), número de hojas del primer brote ($F_{4, 20} = 11,54$; $p=0,0001$), altura del segundo brote ($F_{4, 20} = 6,71$; $p=0,0014$) y número de hojas del segundo brote ($F_{4, 20} = 5,02$; $p=0,0057$); mientras que no se encontraron diferencias significativas en la altura del tercer brote ($F_{4, 20} = 0,58$; $p=0,6798$) y número de hojas del tercer brote ($F_{4, 20} = 0,54$; $p=0,7077$).

En la tabla 17, se presentan los valores sobre el desarrollo de los brotes en la fase de introducción, evaluados a los 20 días después de la siembra, el tratamiento M50 con dosis de nanoplata de 50 mg.L^{-1} de medio de cultivo, presentó los mayores valores en el desarrollo de brotes con 2,2 brotes por microestaca, con una altura del primer y segundo brote de 2,30 cm y 1,60 cm respectivamente, además presentó el mayor número de hojas con 5,6 del primer brote y 4 del segundo brote. Mientras que el testigo (M0) desarrollo de 1,4 brotes por microestaca, con una altura del primer brote de 1,08 cm y del segundo brote de 0,30 cm; con un número de hojas del primer y segundo brote de 2,2 y 0,8. Adicionalmente, se registró el desarrollo de un tercer brote en los tratamientos M25, M50 y M75 (dosis de nanoplata de 25, 50 y 75 mg.L^{-1} de medio de cultivo respectivamente), sin que presentara una diferencia significativa.

Tabla 17*Promedio \pm error estándar de los valores del desarrollo de brotes, tamaño de brotes y número de hojas*

Tratamiento	Numero de Brotes	Altura primer brote (1) (cm)	Número de hojas (1)	Altura segundo brote (2) (cm)	Número de hojas (2)	Altura tercer brote (3)(cm)	Número de hojas (3)
M0	1,4 \pm 0,55 a	1,08 \pm 0,41 a	2,2 \pm 1,10 a	0,30 \pm 0,45 a	0,80 \pm 1,10 a	0 \pm 0 a	0 \pm 0 a
M25	1,6 \pm 0,89 ab	1,70 \pm 0,57 b	3,4 \pm 0,55 b	0,40 \pm 0,55 ab	0,80 \pm 1,10 a	0,06 \pm 0,13 a	0,40 \pm 0,89 a
M50	2,2 \pm 0,45 b	2,30 \pm 0,45 c	5,6 \pm 0,89 d	1,60 \pm 0,22 d	4 \pm 1 b	0,16 \pm 0,36 a	0,20 \pm 0,45 a
M75	2 \pm 0,71 ab	1,7 \pm 0,45 b	4,8 \pm 0,84 cd	0,96 \pm 0,59 bc	2,20 \pm 1,92 a	0,10 \pm 0,2a	0,40 \pm 0,89 a
M100	2 \pm 0 ab	1,60 \pm 0,14 ab	3,8 \pm 0,84 bc	0,96 \pm 0,09 cd	1,8 \pm 0,84 a	0 \pm 0 a	0 \pm 0 a

*medias con letras diferentes son significativamente diferentes

M0	Testigo 0 mg.L ⁻¹ de nanoplata en medio de cultivo.
M25	Tratamiento con dosis de nanoplata de 25 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.
M50	Tratamiento con dosis de nanoplata de 50 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.
M75	Tratamiento con dosis de nanoplata de 75 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.
M100	Tratamiento con dosis de nanoplata de 100 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.

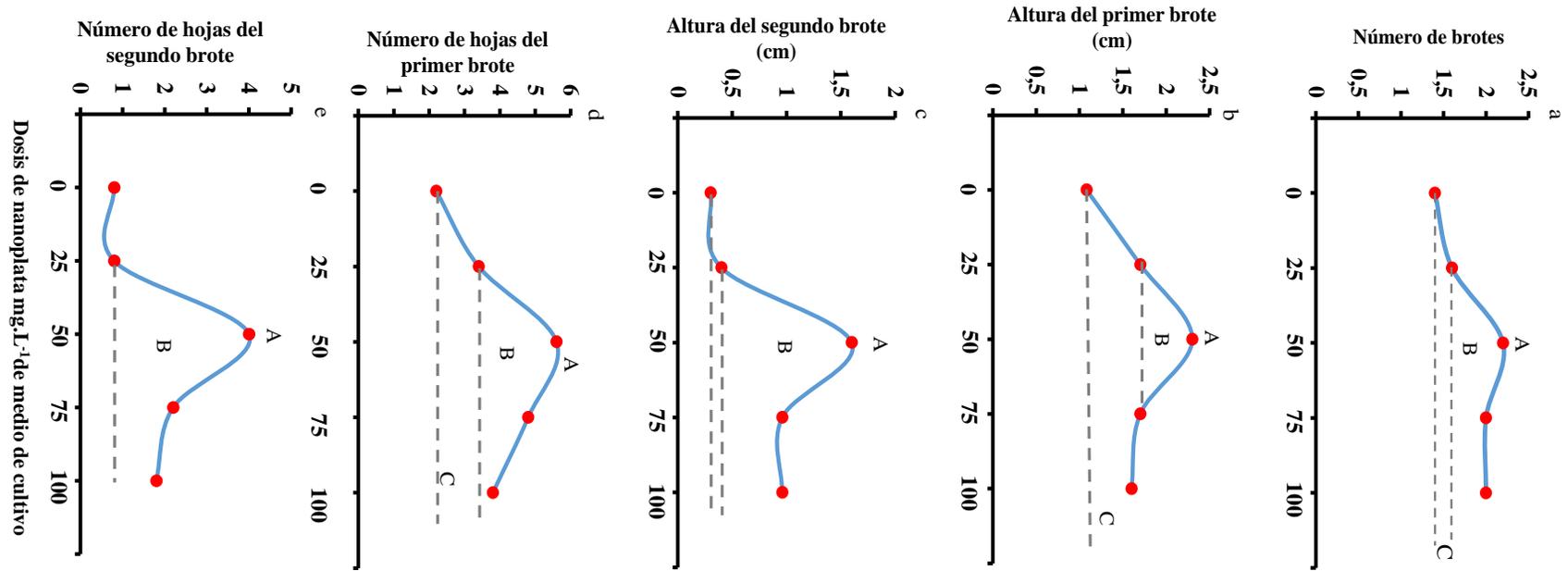


Figura 15 Respuesta de la curva hormética mediante la concentración de nanopartículas de plata en la fase de introducción *in vitro* de microestacas de mora de castilla (*R. glaucus*) después de 20 días de cultivo *in vitro*.

a) número de brotes (cm). b) altura del primer brote (cm). c) altura del segundo brote. d) número de hojas del primer brote. e) número de hojas del segundo brote. A) Máxima respuesta estimulante (B) zona hormética, el ancho de la respuesta estimulante calculado desde el más bajo a la más alta concentración que muestra una respuesta con la respuesta de control (C)

Los resultados obtenidos en la presente investigación fueron similares a los publicados por (Sigarroa & García , 2011), cuando evaluaron dos diferentes medios de cultivo, M1 (medio con ácido giberélico) y M2 (medio con ácido indol acético) en mora de castilla (*R. glaucus*) en la fase de establecimiento (introducción) luego de seis semanas del tratamiento M1 y M2, se obtuvieron crecimientos promedio del brote de 1,21 cm y 0,57 cm, respectivamente. El número de hojas en promedio fue de 5,58 en el tratamiento M1 y 2,45 en el tratamiento M2, tomando en cuenta que no se presentó el desarrollo de un segundo brote, sin embargo a una dosis de nanoplata de 50mg.L⁻¹ evaluada esta investigación se obtuvieron hasta tres brotes.

(Cancino, Quevedo, Villamizar , & Díaz , 2015) en mora de castilla (*R. glaucus*), evaluaron el efecto de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, enfatizando los resultados a dosis de 1ppm de BAP y 0,5 ppm de ácido giberélico, obteniendo un menor desarrollo en el número de hojas, en comparación al uso de la nanoplata a dosis de 50 mg.L⁻¹.

4.5 Evaluación de diferentes dosis de nanoplata en la fase de multiplicación *in vitro* de mora de Castilla (*Rubus glaucus*) para el análisis del efecto hormético en el número de brotes, alturas de brotes y número de hojas de brotes.

El efecto hormético fue evaluado en la fase de multiplicación a los 90 días después del trasplante de un brote que es resultado de la fase de multiplicación, donde se encontraron diferencias significativas en el número de brotes ($F_{4, 20} = 4,44$; $p=0,0099$), altura del brote principal ($F_{4, 20} = 3,66$; $p=0,0216$), número de hojas del brote principal ($F_{4, 20} = 49,17$; $p < 0,0001$), altura del primer brote ($F_{4, 20} = 4,03$; $p=0,0147$), número de hojas del primer brote ($F_{4, 20} = 4,10$; $p=0,0138$), altura del segundo brote ($F_{4, 20} = 2,60$; $p=0,049$), número de hojas del segundo brote ($F_{4, 20} = 2,83$; $p=0,048$), altura del tercer brote ($F_{4, 20} = 2,63$; $p=0,049$) y número de hojas del tercer brote ($F_{4, 20} = 2,64$; $p=0,049$)

En la tabla 18, se presentan los datos sobre el crecimiento del brote principal trasplantado en un medio de multiplicación y los nuevos brotes desarrollados, donde el tratamiento M50 (50 mg.L⁻¹ de nanoplata en el medio de cultivo) presentó un mayor factor de multiplicación de $2,60 \pm 1,3$ brotes extras por brote principal, alcanzando en algunas repeticiones hasta un factor de multiplicación de 4, con una altura del brote principal de 4,02 cm, sin presentar diferencias significativas con los tratamientos M75 (75 mg.L⁻¹ de nanoplata en el medio de cultivo), con una altura de 3,92 cm y, con el tratamiento M100 (100 mg.L⁻¹ de nanoplata en el medio de cultivo), una altura de 3,56 cm del primer brote nuevo de 1,70 cm; 0,94 cm. del segundo brote; 0,36 cm del tercer brote, con un número de hojas de 26,40 del brote principal; del primer brote nuevo de 9,60; del segundo brote nuevo de 4,80 y del tercer brote nuevo, de 1,80.

El testigo (tratamiento M0) presentó, los valores más bajos de las variables analizadas con un factor de multiplicación de 0,20 brotes extras por brote principal; una altura del brote principal de 2,64 cm y de hojas de 15,40 y, del primer brote nuevo, una altura de 0,24 cm y un número de hojas de 1,20.

Tabla 18

Promedio ± error estándar de los resultados del desarrollo de brotes, tamaño de brotes principales - nuevos y número de hojas

Tratamiento	Número de brotes (factor de multiplicación)	Altura brote principal (cm)	Número de hojas brote principal	Altura primer brote (cm)	Número de hojas primer brote	Altura segundo brote (cm)	Número de hojas del segundo brote	Altura tercer brote (cm)	Número de hojas tercer brote
M0	0,20 ± 0,45 a	2,64 ± 0,53 a	15,40 ± 1,34 a	0,24 ± 0,54 a	1,20 ± 2,68 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
M25	1 ± 1 a	3,16 ± 0,48 ab	18,80 ± 0,84 b	0,70 ± 0,65 ab	3,80 ± 3,49 ab	0,40 ± 0,55 ab	1,60 ± 2,19 ab	0 ± 0 a	0 ± 0 a
M50	2,60 ± 1,34 b	4,02 ± 0,66 b	26,40 ± 2,07 d	1,70 ± 0,23 c	9,60 ± 2,88 c	0,94 ± 0,56 b	4,80 ± 2,95 b	0,36 ± 0,50 b	1,80 ± 2,49 b
M75	1,20 ± 0,84 ab	3,92 ± 0,94 b	23,60 ± 1,34 c	1,12 ± 0,63 bc	5,20 ± 3,11 bc	0,42 ± 0,58 ab	2 ± 2,74 ab	0 ± 0 a	0 ± 0 a
M100	0,60 ± 0,89 ^a	3,56 ± 0,62 b	22,20 ± 0,84 c	0,72 ± 0,67 ab	3,40 ± 3,13 ab	0,20 ± 0,45 a	1 ± 2,24 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a

*medias con letras diferentes son significativamente diferentes

M0	Testigo 0 mg.L ⁻¹ de nanoplata en medio de cultivo.
M25	Tratamiento con dosis de nanoplata de 25 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.
M50	Tratamiento con dosis de nanoplata de 50 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.
M75	Tratamiento con dosis de nanoplata de 75 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.
M100	Tratamiento con dosis de nanoplata de 100 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo.

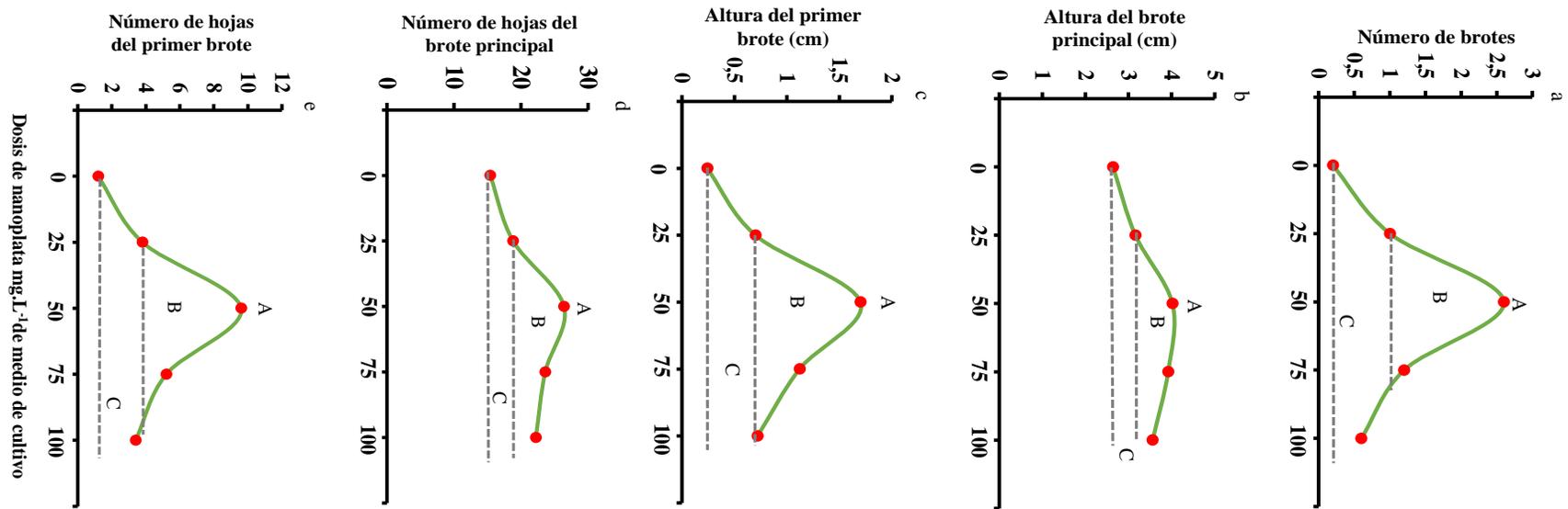


Figura 16 Respuesta de la curva hormética de acuerdo a la concentración de nanopartículas de plata en la fase de multiplicación *in vitro* de brotes de mora de castilla (*R. glaucus*) después de 90 días de cultivo *in vitro*.

a) número de brotes. b) altura del brote principal (cm). c) altura del primer brote (cm). d) número de hojas del brote principal. e) número de hojas del primer brote. A) Máxima respuesta estimulante (B) zona hormética, el ancho de la respuesta estimulante calculado desde el más bajo a la más alta concentración que muestra una respuesta con la respuesta de control (C)

(Spinoso, y otros, 2017), comprobaron el efecto hormético de nanoplata (Argovit) a dosis de 25 y 50 mg.L⁻¹ en el medio de cultivo, obteniendo un mayor desarrollo en número de brotes con 14,33 y 14,89 respectivamente. Además, la longitud de brotes fue de 4,42 cm con 25 mg.L⁻¹ de nanoplata y 4,71 cm con 50 mg.L⁻¹ de nanoplata, en comparación con la dosis mayor de nanoplata de 200 mg.L⁻¹ de medio de cultivo, obtuvo un número de brotes de 4,55 y una longitud de 0,82; el testigo con dosis de nanoplata de 0 mg.L⁻¹ de medio de cultivo, alcanzó un número de brotes de 9,25 con una longitud de 2,15 cm. Lo señalado corrobora los resultados en la presente investigación, ya que dosis de nanoplata de 50 mg.L⁻¹ son suficientes para permitir un desarrollo adecuado de los brotes.

(Sigarroa & García , 2011) quienes evaluaron tres tratamientos con fitohormonas, donde se obtuvieron coeficientes de multiplicación bajos, en comparación a los mejores resultados obtenidos con nanoplata.

4.6 Evaluación de diferentes dosis de nanoplata en la fase de enraizamiento *in vitro* de mora de Castilla (*Rubus glaucus*) para el análisis del efecto hormético en el desarrollo radicular de vitroplantas.

El efecto hormético en la fase de enraizamiento fue evaluado a los 45 días después del trasplante del brote resultado de la fase de multiplicación en donde se encontraron diferencias significativas en la altura de la vitroplanta ($F_{4, 20} = 3,84$; $p=0,018$), número de hojas de la vitroplanta ($F_{4, 20} = 3,84$; $p=0,018$), número de raíces ($F_{4, 20} = 4,44$; $p= 0,0099$) y en la longitud de la primera raíz ($F_{4, 20} = 4,23$; $p= 0,0190$), mientras que no evidenció diferencias significativas en las longitudes de la segunda a la sexta raíz ($F_{4, 20} = 0,79$; $p= 0,5452$).

En la tabla 19, se presentan los resultados del crecimiento de las vitroplantas con los diferentes tratamientos, el tratamiento M50 (50 mg.L⁻¹ de nanoplata en el medio de cultivo) presentó valores más altos: 2,82 cm en altura de vitroplanta; 23,40 en número de hojas, 3,40 en número raíces y 3,38 cm en la longitud de la primera raíz funcional.

Mientras que a partir del desarrollo de la segunda raíz, no se encontraron diferencias significativas en la longitud, los valores más bajos en el desarrollo de las vitroplantas, presentó el tratamiento M0, con una altura de 2,12 cm, número de hojas 15,20, número de raíces de 1,60 y una longitud de la primera raíz de 1,52 cm.

Tabla 19
Promedio ± error estándar de los resultados del desarrollo de hojas, altura y raíces de la vitroplanta

Tratamiento	Altura vitroplanta (cm)	Número de hojas vitroplanta	Número de raíces	Longitud (cm)					
				1era raíz	2da raíz	3era raíz	4ta raíz	5ta raíz	6ta raíz
M0	2,12 ± 0,33 a	15,20 ± 4,76 ab	1,60 ± 1,82 a	1,52 ± 1,53 a	0,66 ± 1,01 a	0,28 ± 0,39 a	0,04 ± 0,09 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
M25	2,42 ± 0,39 ab	17 ± 3,61 ab	2,60 ± 2,61 a	2,02 ± 2,79 a	1,10 ± 1,34 a	0,64 ± 0,72 a	0,38 ± 0,55 a	0,20 ± 0,45 a	0,20 ± 0,45 a
M50	2,82 ± 0,41 b	23,40 ± 5,37 c	3,40 ± 1,95 b	3,38 ± 1,30 b	1,44 ± 1,28 a	1,16 ± 1,26 a	1,02 ± 1,10 a	0,14 ± 0,31 a	0,10 ± 0,22 a
M75	2,38 ± 0,24 ab	20,40 ± 4,72 bc	2 ± 1,22 a	1,96 ± 2 a	1,18 ± 1,89 a	0,80 ± 1,79 a	0,60 ± 1,34 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
M100	2,54 ± 0,60 ab	13,80 ± 3,63 a	2,40 ± 2,19 a	1,96 ± 2,09 a	1,20 ± 1,14 a	0,72 ± 0,83 a	0,60 ± 0,70 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a

*medias con letras diferentes son significativamente diferentes

M0 Testigo 0 mg.L⁻¹ de nanoplata en medio de cultivo.
M25 Tratamiento con dosis de nanoplata de 25 mg.L⁻¹ de medio de cultivo.
M50 Tratamiento con dosis de nanoplata de 50 mg.L⁻¹ de medio de cultivo.
M75 Tratamiento con dosis de nanoplata de 75 mg.L⁻¹ de medio de cultivo.
M100 Tratamiento con dosis de nanoplata de 100 mg.L⁻¹ de medio de cultivo.

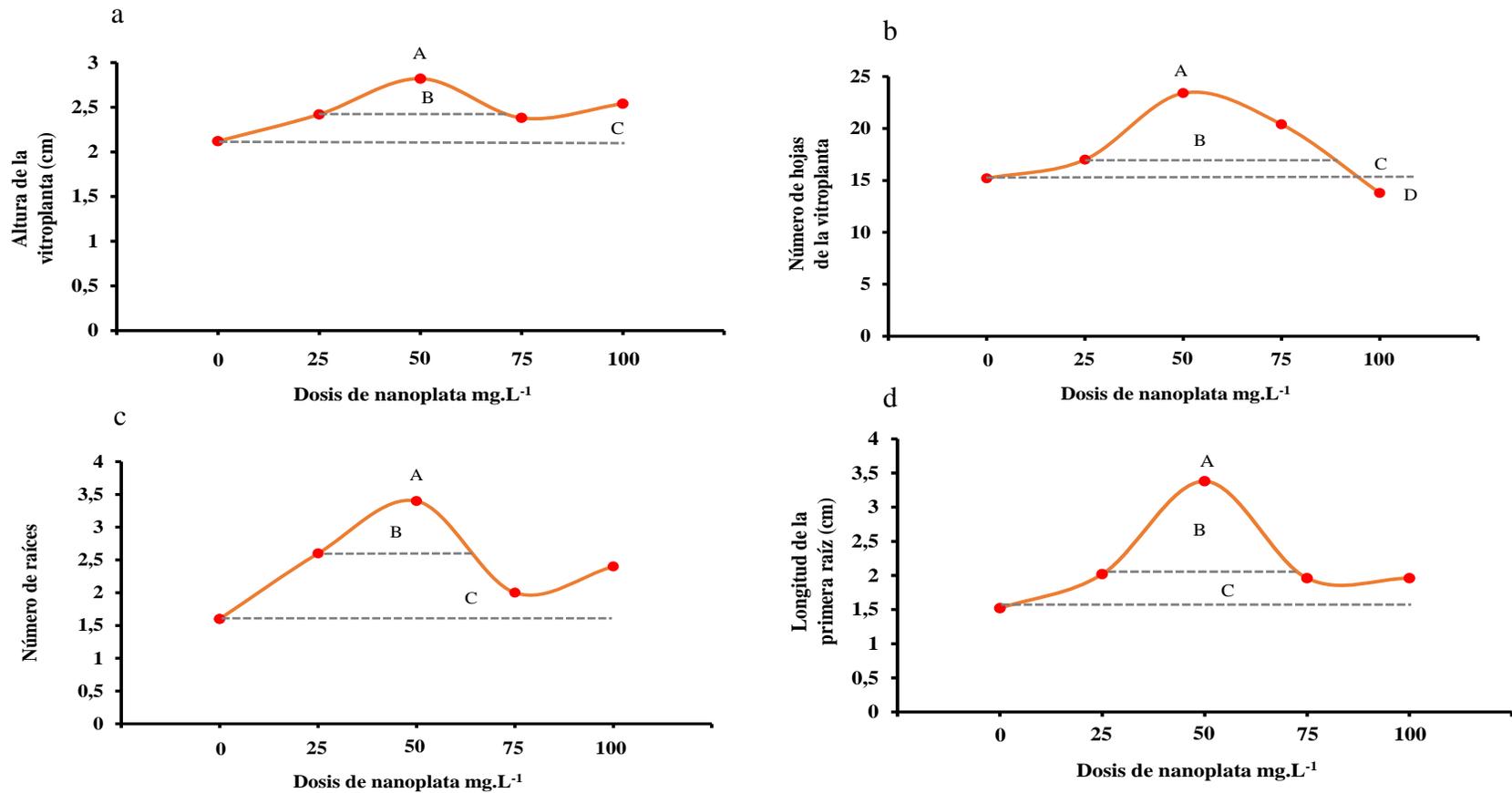


Figura 17 Respuesta de la curva hormética de acuerdo a la concentración de nanopartículas de plata en la fase de enraizamiento *in vitro* de brotes de mora de castilla (*R. glaucus*) después de 45 días de cultivo *in vitro*.

a) altura de la vitroplanta (cm). b) número de hojas de la vitroplanta. c) número de raíces. d) longitud de la primera raíz (cm). A) Máxima respuesta estimulante (B) zona hormética, el ancho de la respuesta estimulante calculado desde el más bajo a la más alta concentración que muestra una respuesta con la respuesta de control (C). y D) umbral tóxico

Tabla 20
Porcentaje de enraizamiento de los tratamientos
evaluados en la regeneración de mora de castilla

Tratamiento	Número de vitroplantas enraizadas	Porcentaje de enraizamiento (%)
M25	3	20
M50	5	60
M75	5	60
M100	3	20
Testigo (M0)	2 vitroplantas enraizadas	
N	5	

M0	Testigo
M25	Tratamiento con dosis de nanoplata de 25 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo
M50	Tratamiento con dosis de nanoplata de 50 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo
M75	Tratamiento con dosis de nanoplata de 75 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo
M100	Tratamiento con dosis de nanoplata de 100 mg.L ⁻¹ de medio de cultivo

En la tabla 20, se observa el efecto de la nanoplata sobre el porcentaje de enraizamiento de las vitroplantas, en comparación al testigo M0, se evidencia que se obtiene un 60% más de enraizamiento para los tratamientos M50 y M75 (50 y 75 mg.L⁻¹ de nanoplata).

(Vaca , 2012) al aplicar auxinas al medio de cultivo para el enraizamiento de mora de castilla (*R. glaucus*), obtuvo un menor desarrollo del sistema radicular, con tres raíces y una longitud de 1,33 cm, a comparación a la investigación a dosis de 50 mg.L⁻¹ de nanoplata, se obtuvo un numero de raíces de seis, con una longitud 4.6, adicionalmente Vaca logró un porcentaje de enraizamiento de plantas *in vitro* a una dosis de 1,5 ppm de AIA del 63%, enfatizando que en esta investigación a dosis de nanoplata de 50 y 75 mg.L⁻¹ se obtuvo un 100% de enraizamiento de vitroplantas.

(Cancino, Quevedo, Villamizar , & Díaz , 2015) al evaluar en mora de castilla (*R. glaucus*) reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, obtuvo un menor desarrollo en el sistema radicular, a comparación de los resultados evidenciados en esta investigación, destacándose la aplicación de 50 mg.L⁻¹ de nanoplata que estimulo un mejor desarrollo radicular de las vitroplantas.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

El uso de nanoplata en concentración de 50 mg.L^{-1} de medio de cultivo MS, logró el mejor efecto hormético y antimicrobiano en la regeneración *in vitro* de plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*).

El mejor efecto antimicrobiano y reducción de fenolización (0%), se logró con nanoplata (AgROVIT) a dosis de 50 mg.L^{-1} en el medio de cultivo MS.

La dosis de nanoplata de 50 mg.L^{-1} en el medio de cultivo (MS), en las fases de: introducción, multiplicación y enraizamiento, lograron efectos positivos en el desarrollo brotes y vitroplantas, evidenciados en los resultados.

El mejor efecto hormético sobre en el incremento de brotes, mayor número de hojas, mayor altura de brote y contenido de clorofila, se obtuvo con dosis de 50 mg.L^{-1} de nanoplata en el medio de cultivo MS.

La nanoplata a 50 mg.L^{-1} de medio nutritivo, permite obtener un mayor desarrollo del sistema radicular y contenido de clorofila en las vitroplantas.

5.2 Recomendaciones

Para la regeneración *in vitro* de mora de castilla, en las fases de introducción, multiplicación y enraizamiento, es imprescindible suplementar nanoplata a dosis de 50 mg.L⁻¹ de medio de cultivo, para evitar contaminación cruzada y endógena además de obtener brotes y vitroplantas con mejor desarrollo.

Se recomienda no usar dosis de nanoplata, en concentraciones mayores a 50 mg en el medio de cultivo, ya que no permite el desarrollo adecuado de explantes, brotes y vitroplantas.

Para evitar el frecuente amarillamiento de hojas *in vitro*, se recomienda el uso de nanoplata en el medio de cultivo.

5.3 Bibliografía

- AgROVIT CP. (2014). *Nanoparticulas de plata utilizadas en el medio de cultivo de tejidos vegetales*. Recuperado el 10 de septiembre de 2017, de <http://www.agrovit.com/>
- Aguilar, M. (2009). *Evaluación de la actividad anti fúngica de nanopartículas de plata*. Instituto Politécnico Nacional, Huatulco Oaxaca. Recuperado el 2017 de abril de 10, de <http://repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/11632>
- Aguinaga, M., & Guanotuña , L. (2013). *Evaluación agronómica y pomológica de clones experimentales de mora de castilla (Rubus glaucus Benth) en Cotacachi*. Universidad Técnica del Norte, Ibarra. Recuperado el 2017 de junio de 01, de <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/2305/1/03%20AGP%20160%20TESIS%20FINAL.pdf>
- Bello, J., Chávez, R., Lecona, C., Bogdanchikova, N., Salinas, J., Gomez, F., & Pestryakov, A. (2017). Hormetic Response by Silver Nanoparticles on In Vitro Multiplication of Sugarcane (*Saccharum spp*). *Dose-Response: An International Journal*, 1-9.
- Berries Argentina. (2015). *Que es la micropropagación y principales ventajas*. Recuperado el 30 de mayo de 2017, de <http://www.berriesdeargentina.com.ar/noticia/42/que-es-la-micropropagacion-y-principales-ventajas.html>
- BullionVault. (2016). *21 increíbles usos de la plata*. Recuperado el 2017 de abril de 28, de <https://oro.bullionvault.es/noticias-oro/infografias/usos-de-la-plata>
- Calabrese, E. (2008). Hormetic Dose-Response Relationships in Immunology: Occurrence, Quantitative Features of the Dose Response, Mechanistic Foundations, and Clinical Implications. Recuperado el 2017 de mayo de 29, de <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408440590917044>
- Cancino, G., Quevedo, E., Villamizar , C., & Díaz , C. (2015). Propagación in vitro de materiales seleccionados de *Rubus glaucus Benth* (mora de Castilla) en la provincia de Pamplona, región nororiental de Colombia. *Revista Colombia Biotecnología*, 17, 7 - 15.

- CICO . (2009). *Centro de información e Inteligencia Comercial*. Recuperado el 2017 de junio de 01, de <http://www.pucesi.edu.ec/pdf/mora.pdf>
- Delgado, F. (2012). *Manejo orgánico del cultivo de mora*. Universidad de Cuenca, Cuenca. Recuperado el 2017 de mayo de 31, de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3074/1/mag129.pdf>
- Dicyt. (2008). *Nuevas tecnologías para el cultivo de mora*. Recuperado el 2017 de abril de 10 , de Dicyt: <http://www.dicyt.com/noticias/nuevas-tecnologias-para-el-cultivo-de-mora>
- Gonzales, C., & Vilca, J. (1998). *Micropropagación vegetativa "in vitro" de aliso (Ainus acuminata)*. Cajamarca.
- Guerrón, A., & Espinoza, E. (2015). *Producción de plantas de mora de castilla*. Universidad Técnica del Norte, Ibarra. Recuperado el 2017 de diciembre de 23, de <http://www.utn.edu.ec/ficayaemprende/?p=474>
- INEN. (2010). *Cultivo de mora*. Recuperado el 2017 de abril de 15 , de INEN: http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/consulta/Sector_Alimentos.pdf
- MAGAP. (2013). En MAGAP, *Mora de Castilla* (pág. 5p). Quito.
- Martínez , A., Beltrán, O., Velastegui, G., Ayala, G., Jácome , R., Yáñez, W., & Valle, E. (2007). *Manual del cultivo de la mora de castilla (Rubus glaucus)*. Ambato.
- Oldenburg, S. (2016). *SIGMA-ALDRICH*. Recuperado el 2017 de abril de 16, de Silver Nanoparticles: Properties and Applications: <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html#intro>
- Perez , J. (2006). *Cultivo in vitro de plantas y sus aplicaciones en agricultura*. Panama - Santa Cruz de Tenerife: ARTE Comunicacion Visual S.L.
- Proaño, A. (2011). *Regeneración y conservación mediante la técnica de crecimiento mínimo de Lupinus mutabilis (Chocho andino) in vitro*. Escuela Politécnica del Ejército, Sangolqui. Recuperado el 2017 de agosto de 28, de <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/3278>

- Rojas , S., Garcia, J., & Alarcon, M. (2004). Propagacion asexual de plantas. Colombia: Corpoica.
- Sagñay, R. (2009). *Evaluación “in vitro” E “in vivo” de la actividad de nanoplata sobre microorganismos oportunistas de sarna sarcóptica en “Cavia porcellus”*. Riobamba.
- Sigarroa, A., & García , C. (2011). Establecimiento y multiplicación in vitro de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.) variedad sin espinas, mediante ápices meristemáticos. *Acta agronómica*, 547 - 554.
- Soria , N., Padilla , F., & Larrea, G. (2011). Guia para el cultivo de la mora de castilla. Patate: Politecnica ESPE.
- Spinoso, J., Chávez, R., Bogdanchikova, N., Pérez , J., Morales , V., & Bello , J. (2017). Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 129, 195 - 207.
- Sumanta, N., Haque, C., Nishika, J., & Suprakash, R. (2014). *Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grow Fern Species Using Various Extracting Solvents*. University EIILM, Sikkim.
- The Silver Institute. (2010). *Silver News*. Obtenido de <https://www.silverinstitute.org/site/wp-content/uploads/2011/08/sp1q10.pdf>
- Vaca , I. (2012). *Regeneración de plantas completas de Rubus glaucus (Benth), mediante el uso de reguladores de crecimiento*. Escuela Superior Politécnica del Ejército, Guayaquil. Recuperado el 2017 de mayo de 10 , de <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/25141/1/Regeneraci%C3%B3n%20de%20plantas%20completas%20de%20Rubus%20glaucus%20in%20vitro.pdf>
- Valdiviezo, K. (2007). *Estudio de la actividad antimicrobiana de nanoplata sobre mastitis subclínica bovina productiva Tunshi*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Recuperado el 2017 de mayo de 20, de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/210>
- Vásquez , C., Orozco, A., Rojas , M., Sánchez , M., & Cervantes , M. (1997). *La reproducción de las plantas: semillas y meristemas*. México.