



**Efecto de tres dosis de Fe-EDTA y Fe-EDDHA, en la aclimatación de explantes de
Rubus glaucus Benth, var. colombiana sin espinas**

Chaves Hidalgo, Celena Jacqueline

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria

Ing. Landázuri Abarca, Pablo Aníbal Mgtr.

31 de enero del 2023



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Certificación:

Certifico que el trabajo de titulación: **Efecto de tres dosis de Fe-EDTA y Fe-EDDHA, en la aclimatación de explantes de *Rubus glaucus* Benth, var. colombiana sin espinas**, fue realizado por la señorita: **Chaves Hidalgo, Celena Jacqueline**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 31 de enero del 2023



PABLO ANIBAL
LANDAZURI ABARCA

Ing. Landázuri Abarca, Pablo Anibal, Mgtr.

C.C 1708262348

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

31/1/23, 12:09

CELENA JACQUELINE CHAVES HIDALGO - TESIS

Informe de originalidad

NOMBRE DEL CURSO
TESIS 2023 UTILIZACIÓN

NOMBRE DEL ALUMNO
CELENA JACQUELINE CHAVES HIDALGO

NOMBRE DEL ARCHIVO
CELENA JACQUELINE CHAVES HIDALGO - TESIS

SE HA CREADO EL INFORME
31 ene 2023

Resumen

Fragmentos marcados	0	0 %
Fragmentos citados o entrecuillados	3	1 %
Coincidencias de la Web		
books.google.com	1	0,5 %
scielo.org.co	1	0,4 %
redalyc.org	1	0,2 %

Activar Win



INGENIERO EN SISTEMAS DE INFORMACIÓN
PABLO ANÍBAL
LANDAZURI ABARCA

Ing. Landázuri Abarca, Pablo Aníbal, Mgtr.

C.C 1708262348



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Chaves Hidalgo, Celena Jacqueline**, con cédula de ciudadanía No. 0401581228 declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo titulación: **Efecto de tres dosis de Fe-EDTA y Fe-EDDHA, en la aclimatación de explantes de *Rubus glaucus* Benth, var. colombiana sin espinas**, es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 31 de enero del 2023

.....
Chaves Hidalgo, Celena Jacqueline

C.C.: 0401581228



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Autorización de Publicación

Yo, **Chaves Hidalgo, Celena Jacqueline**, con cédula de ciudadanía No. 1729717379 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Efecto de tres dosis de Fe-EDTA y Fe-EDDHA, en la aclimatación de explantes de *Rubus glaucus* Benth, var. colombiana sin espinas**, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios es de mi responsabilidad.

Sangolquí, 31 de enero del 2023

.....
Chaves Hidalgo, Celena Jacqueline
C.C.: 0401581228

DEDICATORIA

El presente trabajo es dedicado a mis padres Jorge y Elena, porque todo lo que soy es gracias a ellos que se han sacrificado y esforzado por mí, me han brindado todo su amor, paciencia y apoyo incondicional.

A mis hermanas Anita y Ruby, por ayudarme en todo momento, ser aliadas y cómplices.

A mi abuelito Jorge y toda mi familia que es lo mejor y más valioso que me ha dado Dios.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por ponerme a personas tan especiales en mi vida, que me han ayudado en todo este proceso y a por estar junto a mí en los momentos difíciles.

A mi familia Jorge, Elena, Ruby y Anita, que siempre me han apoyado y gracias a ellos he logrado estar donde estoy.

Al ingeniero Pablo Landázuri, por su generosidad, paciencia, apoyo porque, aunque ha pasado momentos muy duros nunca abandona a sus estudiantes.

A la ingeniera Jaqueline Torres, por aconsejarme y encaminarme, más que una profesora ha sido una amiga.

A mis tutores ing. Pablo Landázuri, Ing. Juan Tigreiro e Ing. Julio Pazmiño por su acompañamiento y por el apoyo en este proceso.

A la señora Alexandra Castillo, que me ayudo y apoyo en el proceso de la tesis, compartiéndome sus experiencias y conocimientos.

A Carolina Gavidia, que nunca me soltó la mano y estuvo conmigo apoyándome en situaciones difíciles y a todos mis amigos Shirley, Kelin, Yhoana, Dani, Juan, por estar siempre pendientes y brindarme su amistad.

A toda mi familia, mis tíos tías y primos por siempre estar dispuestos a brindar ayuda .

Índice de Contenidos

Carátula	1
Certificación.....	2
Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenido	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación.....	5
DEDICATORIA.....	6
AGRADECIMIENTO	7
Índice de Contenidos	8
Índice de tablas	11
Índice de figuras	12
RESUMEN.....	13
ABSTRACT	14
CAPÍTULO I	15
INTRODUCCIÓN	15
Antecedentes.....	15
Justificación	16
Objetivos	17
Objetivo general:	17
Objetivos específicos.....	17
Hipótesis	17
CAPÍTULO II	18
MARCO TEÓRICO	18
Mora (<i>Rubus glaucus</i> Benth)	18

Fases de propagación <i>in vitro</i>	19
Aclimatación de explantes (Fase 4).....	20
Hierro (Fe)	21
Deficiencia de Hierro (Clorosis)	21
Quelatos de Hierro.	21
CAPITULO III	23
METODOLOGÍA.....	23
Ubicación	23
Condiciones de laboratorio	23
Siembra del material Vegetativo.....	24
Pre aclimatación y Aclimatación de las plantas	24
Diseño experimental y análisis de datos	25
Variables a evaluar	26
Porcentaje de enraizamiento	26
Porcentaje de Aclimatación	26
Variables Morfométricas	27
Peso Fresco y Porcentaje de Materia Seca	27
Clorofila	28
Determinación de Fe ⁺²	28
Tipo de diseño	28
CAPITULO IV	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30

Resultados.....	30
Porcentaje de enraizamiento y aclimatación.....	30
Variables Morfométricas.....	30
Peso Fresco.....	31
Porcentaje de Materia Seca.....	33
Clorofila A, B y Total.....	34
Hierro biodisponible (Fe ²⁺).....	35
Discusión.....	36
CAPÍTULO V.....	38
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	38
Conclusiones.....	38
Recomendaciones.....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	39

Índice de tablas

Tabla 1 Datos técnicos de la turba utilizados en el sustrato.	25
Tabla 2 Factores evaluados en la investigación	25
Tabla 3 Ecuaciones para obtención de clorofila en el laboratorio, medias en µg/ml.....	28
Tabla 4 Promedios ± error estándar de variables fisiológicas de <i>Rubus glaucus</i> Benth tratadas con diferentes quelatos de Fe	30
Tabla 5 Promedio ± error estándar de Peso fresco (PF) de <i>Rubus glaucus</i> Benth tratadas con diferentes quelatos de Fe.	32
Tabla 6 Promedio ± error estándar del % de materia seca (MS) de <i>Rubus glaucus</i> Benth tratadas con diferentes quelatos de Fe.	33
Tabla 7 Promedio ± error estándar de clorofila <i>Rubus glaucus</i> Benth tratadas con diferentes quelatos de Fe.	34

Índice de figuras

Figura 1 Selección de material vegetativo	23
Figura 2 Esquema de unidad experimental	25
Figura 3 Medición de longitud de raíz	27
Figura 4 Croquis de la distribución del experimento	29
Figura 5 Desarrollo de planta a las tres semanas de aclimatación, comparación de Fe-EDTA y Fe-EDDHA con testigo	31
Figura 6 Cantidad de clorofila A (Ch-a), clorofila B (Ch-b) y clorofila Total (Ch-Total) para mora (<i>Rubus glaucus</i> Benth var. colombiana sin espinas)	35
Figura 7 Cantidad de Hierro biodisponible (Fe ²⁺) en plantas de <i>Rubus glaucus</i>	36

RESUMEN

El hierro es un micronutriente vegetal esencial para la mayoría de las reacciones metabólicas, principalmente para la clorofila y la fotosíntesis. Los beneficios de los quelatos de hierro en cultivos *ex vitro* se atribuye a la gran estabilidad de estos, permitiendo la fácil asimilación de hierro y el mantenimiento de equilibrio iónico en el medio. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de tres concentraciones de quelatos de hierro, EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) y EDDHA (etilendiamina di-2-hidroxifenilacetato) sobre el enraizamiento y aclimatación de plantas *in vitro* de mora de castilla *Rubus Glaucus* Benth variedad colombiana sin espinas. Utilizando un sustrato, suplementadas con medio líquido de sales macro y micronutrientes de Murashige y Skoog (MS) al 50% sin vitaminas ni hormonas y diferentes dosis (0 mg. L⁻¹, 2.5 mg. L⁻¹, 5 mg. L⁻¹ y 10 mg. L⁻¹) de quelatos de hierro (6 %Fe-EDTA y 9% de Fe- EDDHA). Los resultados obtenidos en el ensayo, demostraron que la aplicación de 10 mg. L⁻¹ de Fe-EDDHA tuvo los mejores resultados, en las variables agronómicas y fisiológicas: largo de raíz (57.90 mm), largo de tallo (76.20 mm), número de hojas (13.56), contenidos de clorofila (61.86 µg. mL⁻¹), hierro biodisponible (6.79 ppm). Se concluye que las plantas aclimatadas de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), variedad colombiana, mejoraron sus parámetros agronómicos y fisiológicos con dosis de 10 mg. L⁻¹ de Fe-EDDHA.

Palabras clave: *Rubus glaucus* Benth, quelatos, Fe-EDTA, Fe-EDDHA, aclimatación

ABSTRACT

Iron is an essential plant micronutrient for most metabolic reactions, mainly for chlorophyll and photosynthesis. The benefits of iron chelates in *ex vitro* cultures are attributed to their high stability, allowing the easy assimilation of iron and the maintenance of ionic equilibrium in the medium. The objective of this research was to evaluate the effect of three concentrations of iron chelates, EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) and EDDHA (ethylenediamine di-2hydroxyphenylacetate) on rooting and acclimatization of *in vitro* blackberry plants *Rubus Glaucus* Benth colombian variety without thorns. Using a substrate, supplemented with liquid medium of macro and micronutrient salts of Murashige and Skoog (MS) at 50% without vitamins or hormones and different doses (0 mg L⁻¹, 2.5 mg L⁻¹, 5 mg L⁻¹ and 10 mg L⁻¹) of iron chelates (6 % Fe-EDTA and 9% Fe-EDDHA). The results obtained in the trial showed that the application of 10 mg. L⁻¹ of Fe-EDDHA had the best results in agronomic and physiological variables: root length (57.90 mm), stem length (76.20 mm), number of leaves (13.56), chlorophyll content (61.86 µg. mL⁻¹), bioavailable iron (6.79 ppm). It is concluded that acclimatized plants of blackberry (*Rubus glaucus* Benth), Colombian variety, improved their agronomic and physiological parameters with doses of 10 mg. L⁻¹ of Fe-EDDHA.

Keywords: *Rubus glaucus* Benth, chelates, Fe-EDTA, Fe-EDDHA, acclimatization

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

La mora (*Rubus glaucus* Benth), es un cultivo perenne, arbustivo, de tallo rastrero o semierguídos, González *et al.* (2019). Es un fruta rica en minerales, Villegas & Albarracín (2016), vitamina C, fibra dietética y antioxidantes, Hunková *et al.* (2018). Existe interés por exportarla en fresco y procesada a países demandantes como: Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Alemania, Francia, Austria, Italia, Holanda, Bélgica, y Japón Galarza *et al.* (2016).

En Ecuador se siembra 5 247 ha de mora de castilla *Rubus glaucus* Benth, y constituye la principal fuente de ingresos económicos para aproximadamente 15 000 pequeños y medianos productores, Iza (2018), A escala nacional, Tungurahua es la provincia con mayor producción con el 50 %, MAG (2022) y el 50 % restante está distribuido en las provincias de Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Imbabura y Carchi, Galarza *et al.* (2016). Los rendimientos de la mora han ido aumentados con el paso de los años, en el 2014 la producción nacional era de 2.19 t.ha⁻¹, mientras que en el 2016 esta producción fue de 6.80 t.ha⁻¹, INIAP (2016).

Hay diferentes métodos para la obtención de plántulas de mora, utilizando: semillas, acodo, estacas, Marulanda *et al.* (2017). Sin embargo, estos métodos requieren mucho tiempo y contribuyen a la propagación de patógenos, Cancino *et al.* (2015). La micropropagación es una técnica recomendada comercialmente, por ser un método de rápida propagación masiva y rentable, Franco *et al.* (2020). Permite tener plántulas libres de virus y genéticamente estables en condiciones controladas Sokolov *et al.* (2015).

La aclimatación de *Rubus* resultantes de cultivo *in vitro* es una fase crítica, Roveda *et al.* (2007). Ya que la supervivencia de las plantas puede verse afectada bajo condiciones adecuadas, como: un ambiente estéril, alta humedad relativa y un medio rico en nutrientes, La aclimatación de *Rubus* resultantes de cultivo *in vitro* es una fase crítica, Roveda *et al.* (2007), ya

que la supervivencia de las plantas puede verse afectada bajo condiciones adecuadas, como: un ambiente estéril, alta humedad relativa y un medio rico en nutrientes, presentadas en el medio de crecimiento, Gil et al. (2017), mientras que, en esta fase, las plantas se enfrentan a un estrés por la ausencia de estos factores.

Justificación

La mora sin espinas tiene un mayor número de ramas productoras y un macollamiento entre 15% y 20% más que la mora tradicional, Bernal & Díaz (2006). Con el objetivo de obtener una uniformidad y calidad de la variedad sin espinas, la mejor forma es la regeneración de plantas *in vitro*, Gil et al. (2017).

La clorosis férrica es producida por una deficiencia de hierro común en los cultivos de bayas, que se manifiesta como un amarillamiento de las zonas intervenales de las hojas jóvenes Alvarez et al. (2006), y que se corrige con la aplicación de FeSO₄ o Fe-EDDHA (Ácido etilendiaminotetraacético), Castro & Cerdas (2005). Existen diversos tipos de clorosis, entre ellas la deficiencia de hierro, considerada como uno de los desórdenes nutricionales más comunes en diversos cultivos, Sanz & Montañés (1997). La mora de castilla *Rubus glaucus* Benth sin espinas, puede presentar esta deficiencia desde plantas provenientes de explantes multiplicados *in vitro* desde las fases iniciales de regeneración, Vaca & Landázuri (2013).

En un estudio realizado por Hunkova y otros autores en el 2018, se determinó que el ácido etilendiaminotetraacético (Fe-EDTA 9%) al medio de cultivo MS aumento significativamente la tasa de multiplicación de brotes *in vitro* de *Alchemilla mollis*. Por otro lado, Zawadzka y Orlikowska en el 2009, concluyo que la etilendiamina di-2-hidroxifenilacetato (FeEDDHA) añadido al medio de cultivo MS redujo la clorosis, aumento el contenido de clorofila y fue eficaz en la regeneración adventicia de *Rubus idaeus* L.

El FeEDDHA se ha utilizado para superar la clorosis férrica en cultivos de rosa, Metroflor-agro (2022) soya, frijol, Franco et al. (2018), tomate, Barra (2018) y también en

cultivos *in vitro* de *Rosa hybrida* L. Van der Salm *et al.* (1994), frambuesa roja, Zawadzka & Orlikowska (2006) almendra amarga y naranja agria, Shibli *et al.* (2002).

Kodym & Zapata en el 2001), observaron un aumento en la intensidad del color de las hojas de plátano. En base a la literatura presentada, no se han encontrado investigaciones en las cuales indiquen el efecto de los quelatos de hierro EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) y EDDHA (etilendiamina di-2-hidroxifenilacetato) sobre la aclimatación de *Rubus glaucus* Benth sin espinas.

Objetivos

Objetivo general:

Identificar la dosis óptima del Fe-EDTA y Fe-EDDHA, en la aclimatación de explantes de *Rubus glaucus* Benth sin espinas.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto de tres dosis (2.5, 5 y 10 mg. L⁻¹) de Hierro como Fe-EDTA y Fe-EDDHA sobre el enraizamiento, de explantes de mora de Castilla sin espinas *Rubus glaucus* Benth
- Evaluar el efecto de las tres dosis (2.5, 5 y 10 mg. L⁻¹) de Hierro como Fe-EDTA y Fe-EDDHA sobre variables agronómicas y fisiológicas en plantas aclimatadas de mora de Castilla sin espinas *Rubus glaucus* Benth.

Hipótesis

- H0: Los quelatos y las tres dosis (2.5, 5 y 10 mg. L⁻¹) de Fe aplicados a explantes *in vitro* no tienen efecto en el número de explantes aclimatados de mora.
- H1: Los quelatos y las tres dosis (2.5, 5 y 10 mg. L⁻¹) de Fe aplicados a explantes *in vitro* tienen efecto en el número de explantes aclimatados de mora.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Mora (*Rubus glaucus* Benth)

Rubus glaucus Benth, se conoce como mora de los Andes o mora de castilla, es una especie única que fusiona los genomas de los subgéneros *Idaeobatus* y *Rubus*, Marulanda *et al.* (2017). Se la puede consumir en fresco, entera, en jugos o procesada (pulpa, mermeladas, refrescos, vinos y lácteos), Vaca, (2012) Es una fruta rica en minerales, Villegas & Albarracín (2016), vitamina C, fibra dietética y antioxidantes, Hunková *et al.* (2018), Existe interés por exportarla en fresco y procesada a países demandantes como: Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Alemania, Francia, Austria, Italia, Holanda, Bélgica, y Japón, Galarza *et al.* (2016).

La mora, pertenece a la familia Rosaceae, del género *Rubus* formada aproximadamente por 700 especies, de las cuales 21 se registran en Ecuador. Son plantas tipo arbustiva, Vaca (2012) y perenne, de porte erecto a semierecto, es cultivada en la sierra ecuatoriana, entre 2500 y 3000 m.s.n.m. Galarza *et al.* (2016). Presenta una raíz fasciculada que puede alcanzar entre 30 y 50 cm y una corona en su base con gran número de tallos Grijalba *et al.* (2010). Los tejidos son de color verde en el haz y blanquecino en el envés, Bolaños *et al.* (2020).

La multiplicación de la mora puede ser de manera sexual (semillas) o asexual (partes de la mimosa plata). Tradicionalmente la propagación de la mora se realiza por multiplicación de hijuelos o por raíces, Franco *et al.* (2018).

La variedad Colombiana sin espinas, presenta facilidad en la cosecha y demás labores agrícolas, eliminando los riesgos para los operarios, Bernal & Díaz (2006). En el Ecuador se cultivan diferentes variedades de mora sin espina, como; Colombiana, Brazos y Andimora Galarza *et al.* (2006).

Esta variedad se caracteriza por tener mayor cantidad de ramas productivas, alcanza un rendimiento de 6 Kg.planta⁻¹, es una planta precoz, Bonilla (2013). Esta mora sin espinas presenta mayor crecimiento y tasa de supervivencia durante la fase de aclimatación que el resto

de las variedades, Vaca & Landázuri (2013).

Cultivo *in vitro* de *Rubus*

El cultivo de tejidos conocido también como micropropagación o cultivo *in vitro*, es una técnica de biotecnología, Cancino *et al.* (2015), que se basa en la “totipotencia celular”, Vaca (2012), es decir, que mediante células, tejidos u órganos vegetales bajo condiciones controladas, permiten la regenerar plantas completas libres de plagas y enfermedades, con rendimientos altos, calidad de fruta y uniformidad, Castro & Cerdas (2005). El material se obtiene de yemas, meristemos, tejidos vegetales o células individuales de una planta seccionada, Castillo (2006).

Broome & Zimmerman en 1978, desarrollaron el primer trabajo de micropropagación de *Rubus*, utilizando los cultivares thorneless y harper, con el objetivo de una masiva propagación de plantas, Cancino *et al.* (2015). Marulanda *et al.*, en el 2000, realizaron el primer trabajo de micropropagación con *Rubus glaucus* Benth, para obtener plántulas sanas y de buena calidad para los productores de la zona de Risaralda, Colombia.

Los métodos tradicionales de propagación (semilla, acodos o estacas) de *Rubus*, presentan desventajas, como, pocas semillas viables, cultivos desuniformes, lento crecimiento y desarrollo de plantas, Delgado (2012), La micropopagación es una técnica recomendada comercialmente, por ser un método de propagación masiva y rentable de *Rubus*, Franco *et al.* (2020), libre de virus y genéticamente estables en condiciones controladas, Sokolov *et al.* (2015).

Fases de propagación *in vitro*

Selección y Desinfección (Fase 0): Se selecciona la planta madre, de donde se extraen los explantes sin patógenos, saludables y jóvenes. Para el género *Rubus* se ha reportado que los tejidos viables son de callos, meristemos y yemas, Cancino *et al.* (2015). Una vez seleccionado el explante se realiza una desinfección superficial, aplicando agua destilada,

alcohol, bactericidas, fungicida, hipoclorito de sodio o calcio en disoluciones, Jones & Flores (2007).

Establecimiento (Fase 1): los explantes se trasladan a la cámara de flujo laminar para ser cultivados en un medio estéril, Castillo (2006), puede ser en tubos de ensayo o frascos de vidrio, Betancour & Rojas (2011). El establecimiento de mora, tiene una duración de dos semanas, Vaca & Landázuri (2013).

Multiplicación (Fase 2): Los brotes que sobreviven al establecimiento son trasladados a un nuevo medio de cultivo, manteniendo las condiciones de asepsia, Solís (2019), en esta fase los brotes permanecen 2 meses, Vaca & Landázuri (2013).

Enraizamiento (Fase 3): Los brotes son trasladados a medio Murashige y Skoog (MS), Zawadzka & Orlikowska (2009). En esta fase se utilizan los brotes, con una longitud de 2 cm, cuando las plantas producen raíces en medio de la multiplicación no es necesario pasar por la fase de enraizamiento, Castillo (2006). Las plantas deben permanecer en esta etapa durante 35 días, Vaca & Landázuri (2013).

Aclimatación de explantes (Fase 4)

El éxito o fracaso de todo el proceso depende de esta fase, ya que los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, Castillo (2006). Es la fase final del proceso, y la más importante, ya que en esta etapa las plantas deben convertirse en autótrofas, por esta razón el medio debe estar constituido de altas cantidades de reguladores del crecimiento, también macronutrientes (C, K, N, P, H, O, S, Mg y Ca) y micronutrientes (Fe, Zn, Cl, Mo, B y Mn), Jones & Flores (2007).

Las condiciones especiales en la que se desarrollan los explantes durante la micropropagación, incluye: temperatura de 20 ± 2 °C, luminosidad de 2000 lux, fotoperiodo de 16 horas luz, Jones & Flores (2007), alta humedad relativa, ausencia de intercambio gaseoso, medio ambiente aséptico, Vaca & Landázuri (2013), dando como resultado plantas semiautótrofas, poco desarrolladas, incapaces de regular la transpiración e intercambio

gaseoso, sin habilidad de producir azúcares; por estas razones es necesario corregir dichas anomalías de las plantas para que puedan tener un óptimo desarrollo fuera del ambiente controlado, Marulanda *et al.* (2017).

Hierro (Fe)

El hierro (Fe) se clasifica como un micronutriente, es decir, que las plantas lo necesitan en cantidades menores que los macronutrientes primarios o secundarios, Jomaa (2002). De los micronutrientes, el hierro es el más importante ya que se lo necesita en mayor cantidad, Kyrkby & Römheld (2007).

El hierro es uno de los microelementos utilizados en la micropropagación, ya que es esencial en muchos procesos como la clorofila y la síntesis del ADN, Antonopoulou *et al.* (2007). Además, el Fe es parte de las peroxidasas, que median el catabolismo del IAA, y también son marcadores de las sucesivas fases de enraizamiento. La alta afinidad de Fe para formar complejos con varios ligandos (ácidos orgánicos y fosfatos) y la facilidad de cambio de valencia son las dos características más importantes que forman parte de los numerosos efectos fisiológicos de este nutriente, Guijarro & Bermúdez (2003).

Deficiencia de Hierro (Clorosis)

El hierro es un micronutriente vegetal esencial para la mayoría de las reacciones metabólicas, principalmente para la clorofila y la fotosíntesis. La deficiencia de este conlleva a un amarillamiento en la zona intervenal de las hojas, Lucena (2009). La clorosis es un problema amplio, distribuido a nivel mundial, se encuentra en plantas monocotiledóneas, dicotiledóneas y especialmente en rosáceas, Cerdás, (2003).

Quelatos de Hierro.

Los quelatos de hierro son compuestos organo-metálicos, que se forman por la unión entre el hierro y un anión orgánica, llamado ligando o agente quelatante, Alvarez *et al.* (2006). Los agentes quelatantes más utilizados en agricultura son de origen sintético, y son conocidos

por siglas que se refieren al nombre de la molécula, algunos quelatos conocidos son: EDTA, EDDHA, EDDHMA, HEDTA, DTPA, Chrysovalantou *et al.* (2007).

Los quelatos de hierro como el Fe-EDDHA y Fe-EDTA, se utiliza para controlar la clorosis férrica en plantas *in vitro*, Cerdán (2003). Zawadzka y Orlikowska en el 2009) realizaron una investigación con 5 cultivares de *Rubus idaeus*, en la cual utilizaron 6.7 mg. L⁻¹ de FeNaEDTA en el medio de enraizamiento de sales MS, dando lugar a un mayor contenido de clorofila, un enraizamiento abundante (8.7 frente a 5.3 raíces por brote) y precoz. La presencia de FeEDDHA, en el medio de enraizamiento aumento el contenido de clorofila en todos los cultivares durante 6 semanas de enraizamiento *in vitro* y durante 5 semanas de aclimatación en 3 de los 5 cultivares de *Rubus*.

Los efectos benéficos del FeEDDHA en los cultivos *in vitro* se atribuye a la gran estabilidad de este quelato de hierro, que permite la adquisición de hierro u el mantenimiento de un equilibrio iónico inicial constante en el medio, Molassiotis & Dimassi (2003). El FeEDDHA influye en la rizogénesis *in vitro* y en la aclimatación de microplantas de frambuesa, Zawadzka & Orlikowska (2006)

CAPITULO III

METODOLOGÍA

Ubicación

La investigación se realizó en el laboratorio de AGROBIOTECH, ubicado en la provincia de Pichincha, cantón Quito parroquia Tumbaco a una altitud de 2 320 msnm, latitud de 0°11'10.9"S. y longitud de 78°22'49.0"O.

Condiciones de laboratorio

El proyecto se instaló en el cuarto de crecimiento del laboratorio, a una temperatura de 20°C ± 2, fotoperiodos de 12 horas y luz PAR (Photon Active Reaction) de 16.85µmol m².s⁻¹.

Selección del material vegetativo

El material se obtuvo de la fase previa de la multiplicación *in vitro*, se utilizaron un total de 210 apicales de *Rubus glaucus* Benth, Var. Colombiana sin espinas, con una longitud de 30 a 50 mm y con 3 hojas como mínimo (Figura 1).

Figura 1

Selección de material vegetativo.



Nota. Apicales provenientes de la fase de multiplicación. Autoría Propia

Siembra del material Vegetativo

Una vez seleccionados los explantes, se sembraron diez en envases plásticos de 13 cm de profundidad, 16.5 cm de ancho y 24 cm de largo que constituyeron la unidad experimental (Figura 2). Dichos envases previamente llenados con 120 g de turba (Tabla 1), 90 g de pomina esterilizados en autoclave a 120 psi durante 20 minutos.

El sustrato fue humedecido con 140 ml de medio líquido, cuya base fueron las sales MS al 50% y suplementados con las diferentes dosis de Fe-EDTA (6 % de Fe) y EDDHA (9% de Fe). Los medios de cultivo (MS 50% + Fe-EDTA o EDDHA) previo a su aplicación en los envases plásticos fueron ajustados a un pH de 5.6 y esterilizados en autoclave a 120 psi durante 20 minutos.

Pre aclimatación y Aclimatación de las plantas

Una vez sembradas las plantas, se llevaron al cuarto de crecimiento (temperatura $20^{\circ}\text{C}\pm 2$, fotoperiodos 12H, luz PAR $16.85\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), donde enraizaron, durante dos semanas. Posteriormente a este periodo las plantas fueron llevadas a un cuarto de pre-aclimatación (Temperatura $16-22^{\circ}\text{C}$, Fotoperiodo de 12H) y se procedió a perforar la base de los recipientes. Luego se volvieron a regar cada uno de los tratamientos, con el medio de cultivo ya descrito.

Luego de dos semanas de pre aclimatación se trasladó las plantas al invernadero para su aclimatación, donde se trasplantaron en vasos de 12 oz, con 40 g de turba, 30 g de pomina y 50 ml de solución del tratamiento correspondiente.

Figura 2

Esquema de unidad experimental.



Nota. Autoría propia

Tabla 1

Datos técnicos de la turba utilizados en el sustrato

pH	5.6
Salinidad	0.8 g.L ⁻¹
N	140 mg. L ⁻¹
P2O5	80 mg. L ⁻¹
K2O	190 mg. L ⁻¹
Estructura	Fina
Proporción del NPK	1-0.6-1.4
PG-Mix 18-10-20	0.80Kg. m ²

Nota. Características de turba Floragard tipo Seed 1, utilizada en el ensayo. Autor Floragard (2023)

Diseño experimental y análisis de datos

Para este estudio se aprobaron dos factores; dosis de quelato (0 mg. L⁻¹, 2.5 mg. L⁻¹, 5 mg. L⁻¹, 10 mg. L⁻¹) y tipo de quelato (EDTA y EDDHA) (Tabla 2), su interacción conforma los tratamientos (Tabla 2)

Tabla 2*Factores evaluados en la investigación*

Dosis	Quelato	Tratamiento
0 mg. L ⁻¹	Sin Producto	T0
2.5 mg. L ⁻¹	EDTA	T1
5 mg. L ⁻¹	EDTA	T2
10 mg. L ⁻¹	EDTA	T3
2.5 mg. L ⁻¹	EDDHA	T4
5 mg. L ⁻¹	EDDHA	T5
10 mg. L ⁻¹	EDDHA	T6

Nota. En la tabla se presenta la descripción de cada tratamiento evaluado en la investigación. Autoría Propia.

Variables a evaluar

Porcentaje de enraizamiento

Esta variable se evaluó una vez terminado el ensayo, luego de dos semanas después de la siembra en el cuarto de crecimiento, se contabilizaron el número de explantes enraizados y no enraizados, el porcentaje de enraizamiento se determinó con la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Enraizamiento} = \frac{\text{Total de explante} - \text{explantes no enraizados}}{\text{Total de explantes}} \times 100$$

Porcentaje de Aclimatación

Al cabo de cuatro semanas, posterior a la fase de enraizamiento *ex vitro*, se contabilizo la cantidad de plántulas viables, se procedió a calcular el porcentaje de aclimatación, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Aclimatación} = \frac{\text{Total de plantulas} - \text{Plantulas muertas}}{\text{Total de plantulas}} \times 100$$

Variables Morfométricas

Se evaluaron una vez, al final del ensayo, las siguientes variables morfométricas: el número de hojas se contabilizó manualmente, la longitud de raíz y tallo se midió en milímetros mediante el uso de un vernier (Figura 3)

Figura 3

Medición de longitud de raíz



Nota. Autoria propia

Peso Fresco y Porcentaje de Materia Seca

Al final del ensayo para la medición del peso fresco en gramos, se dividió la zona radicular, del área foliar y se pesó en una balanza analítica. Mientras que, para el porcentaje de materia seca, las muestras fueron colocadas en bolsas de papel, las cuales fueron etiquetadas. Luego se las llevó al horno a temperatura de 90 °C durante 24 horas, transcurrido este tiempo se pesaron las 21 muestras. El porcentaje de materia seca se obtuvo utilizando la fórmula de, Petruzzi *et al.* (2005).

$$\% \text{ materia seca} = \left(\frac{\text{Peso materia seca}}{\text{Peso materia fresca}} \right) \times 100$$

Clorofila

Para analizar la cantidad de clorofila se pesaron 0.25 g de hojas de mora las cuales fueron maceradas y colocadas en tubos de ensayo con 2.5 ml de etanol, luego se dejaron reposar por 24 horas en la oscuridad a una temperatura de -4 °C, una vez transcurrido el tiempo se aforó la muestra a 6.25 ml y se procedió a centrifugar durante 15 min, y se determinó la clorofila mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 649 y 664 nm, Yépez (2018).

Tabla 3

Ecuaciones para obtención de clorofila en el laboratorio, medias en µg/m

Solventes	Ecuaciones
95% Etanol	Ch-a=13.36 A(664) – 5.19 A(649)
	Ch-b=27.43 A(649) – 8.12 A(664)

Nota. a: Absorción, Ch-a: Clorofila a, Ch-b: Clorofila b. Autor Yépez (2018)

Determinación de Fe²⁺

Se pesó 2 g de materia vegetal fresca, se cortó en finas partes para colocar la muestra en tubo de ensayo con 7 ml al 1.5% (p/p) de 1-10 Fenantrolina (en H₂O, ajustado a pH 3 con 1 M de HCl). Después de 16 horas, las muestras se centrifugaron, y la concentración de Fe²⁺ fue determinada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 510 nm, Galvez (2009).

Tipo de diseño

El experimento se dispuso bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA) en arreglo bifactorial 2x3 más un testigo con 3 repeticiones (Figura 3), cuyo modelo matemático fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + Z_i + Q_j + e_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = variable medida

μ = media general

Z_i = Efecto de la i-ésima concentración de Fe

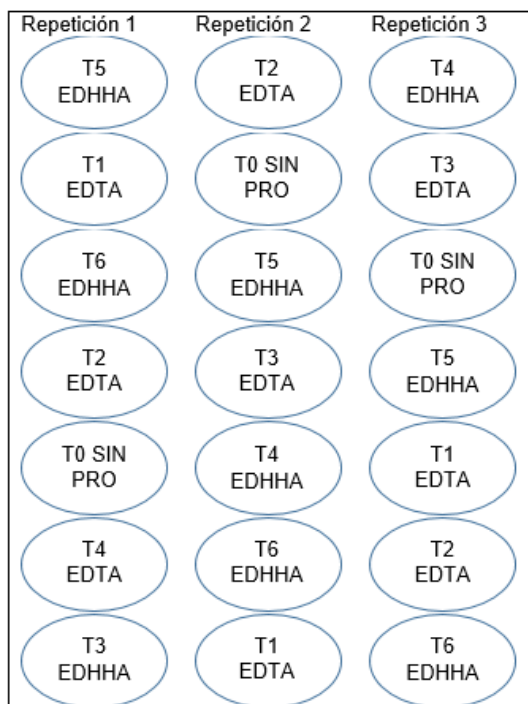
Q_j = Efecto de la j-ésima efecto del tipo de Quelato

e_{ijk} = Error experimental

El análisis de datos de las variables morfométricas, peso fresco y porcentaje de materia seca se analizaron mediante estadística descriptiva y compararon mediante la prueba de discriminación de medias de Tukey a un nivel de confianza del 95%, utilizando el software INFOSTAT.

Figura 4

Croquis de la distribución del experimento



Nota. Autoría Propia

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Porcentaje de enraizamiento y aclimatación

El enraizamiento y la aclimatación de la mora de castilla *Rubus glaucus* Benth var. colombiana sin espinas fue del 100 % para las dos variables.

Variables Morfométricas

Para las variables morfométricas largo de tallo ($F_{6,104}=15.12$; $p=0.002$), número de hojas ($F_{6,104}= 19.98$; $p=0.0001$) y largo de raíz ($F_{6,104}=5.9$; $p=0.0014$) (Tabla 4), se encontraron diferencias significativas entre la interacción tipo de quelato dosis.

Tabla 4

Promedios \pm error estándar de variables fisiológicas de Rubus glaucus Benth tratadas con diferentes quelatos de Fe

Tratamientos	Largo de tallo (mm)	Numero de Hojas	Largo de raíz (mm)
T0	52.87 \pm 1.29 a	7.44 \pm 0.18 a	12.98 \pm 0.29 a
T1	64.57 \pm 1.89 c	9.00 \pm 0.29 b	44.20 \pm 1.24 b
T2	62.67 \pm 0.88 bc	10.36 \pm 0.34 bc	45.70 \pm 0.84 b
T3	57.03 \pm 0.98 b	10.89 \pm 0.33 c	47.03 \pm 0.86 c
T4	66.87 \pm 1.93 c	11.44 \pm 0.26 c	49.03 \pm 1.95 c
T5	74.77 \pm 1.29 d	10.56 \pm 0.24c	55.35 \pm 1.79 cd
T6	76.20 \pm 2.14 d	13.56 \pm 0.47d	57.90 \pm 1.50 d

Nota. T0: sin producto, T1: EDTA con dosis de 2.5 mg. L⁻¹, T2: EDTA con dosis de 5 mg. L⁻¹, T3: EDTA con dosis de 10 mg. L⁻¹, T4: EDDHA con dosis de 2.5 mg. L⁻¹, T5: EDDHA con dosis de 5 mg. L⁻¹, T6: EDDHA con dosis de 10 mg. L⁻¹, medias con letra diferente son significativamente diferentes ($p>0.05$). Autoría propia.

En la variable largo de tallo, los tratamientos con 10 mg. L⁻¹ y 5 mg. L⁻¹ Fe-EDDHA, obtuvieron una longitud de 76.20 \pm 2.14mm y 74.77 \pm 1.29mm respectivamente, a diferencia

de los tratamientos con Fe-EDTA y el testigo que obtuvieron una longitud menor a 70 mm (Tabla 4).

En el número de hojas, la dosis de 10 mg L⁻¹ de Fe-EDDHA (T6), tuvo el promedio más alto con 13.56±0.47, a diferencia de los demás tratamientos.

Con respecto a la longitud de raíz, los tratamientos T6 (10 mg. L⁻¹ Fe-EDDHA), T3 (10 mg. L⁻¹ EDTA) y T5 (5 mg. L⁻¹ de EDDHA) obtuvieron una longitud de 57.90±1.50 mm, 57.03±0.86 mm y 55.35±1.79 mm, respectivamente.

Figura 5

Desarrollo de planta a las tres semanas de aclimatación, comparación de EDTA y EDDHA con testigo



Nota. T0: sin producto, T1: EDTA con dosis de 2.5 mg. L⁻¹, T2: EDTA con dosis de 5 mg. L⁻¹, T3: EDTA con dosis de 10 mg. L⁻¹, T4: EDDHA con dosis de 2.5 mg. L⁻¹, T5: EDDHA con dosis de 5 mg. L⁻¹, T6: EDDHA con dosis de 10 mg. L⁻¹, Autoría propia.

Peso Fresco

En el peso fresco de raíz ($F_{6,62}=35.3$; $p=0.002$), como en el peso fresco de tallo ($F_{6,62}=35.64$; $p=0.0016$) y en peso fresco total ($F_{6,62}=21.77$; $p=0.0012$), se encontraron ó diferencias significativas (Tabla 5).

Tabla 5

Promedio \pm error estándar de Peso fresco (PF) de *Rubus glaucus* Benth tratadas con diferentes quelatos de Fe

Tratamientos	PF Raíz (g)	PF Planta (g)	PF Total
T0	0.023 \pm 0.001 a	0.237 \pm 0.001 a	0.260 \pm 0.002 a
T1	0.033 \pm 0.002 b	0.253 \pm 0.001 b	0.282 \pm 0.001 b
T2	0.033 \pm 0.002 b	0.249 \pm 0.001 b	0.286 \pm 0.002bc
T3	0.042 \pm 0.001 c	0.253 \pm 0.002 c	0.291 \pm 0.002 c
T4	0.044 \pm 0.002 c	0.259 \pm 0.002 d	0.303 \pm 0.002 d
T5	0.065 \pm 0.001 d	0.316 \pm 0.002 e	0.381 \pm 0.001 d
T6	0.068 \pm 0.001 d	0.319 \pm 0.002 e	0.387 \pm 0.001 e

Nota. T0: sin producto, T1: EDTA con dosis de 2.5 mg. L⁻¹, T2: EDTA con dosis de 5 mg. L⁻¹, T3: EDTA con dosis de 10 mg. L⁻¹, T4: EDDHA con dosis de 2.5 mg. L⁻¹, T5: EDDHA con dosis de 5 mg. L⁻¹, T6: EDDHA con dosis de 10 mg. L⁻¹, medias con letra diferente son significativamente diferentes ($p > 0.05$). Autoría propia.

Para el peso fresco de raíz, los tratamientos T5 (Fe-EDDHA 5 mg. L⁻¹) y T6 (Fe-EDDHA 10 mg. L⁻¹) obtuvieron los valores más altos con un promedio de 0.065 \pm 0.001 g y 0.068 \pm 0.001 g, respectivamente a diferencia del testigo y los demás tratamientos.

En el peso fresco del tallo, los tratamientos que resultaron con mayor promedio fueron las plantas que contenían Fe-EDDHA, es decir, los tratamientos: T4 (EDDHA 2.5 mg. L⁻¹) con 0.259 \pm 0.002 g, T5 (EDDHA 5 mg. L⁻¹) con 0.316 \pm 0.002 g y T6 (EDDHA 10 mg. L⁻¹) con 0.319 \pm 0.002 g.

Con respecto al peso fresco total los tratamientos: T6 (10 mg. L⁻¹ Fe-EDDHA) y T5 (5 mg. L⁻¹ Fe-EDDHA) presenta valores más altos con un promedio de 0.387 \pm 0.0015 g, a comparación del testigo y los demás tratamientos.

Porcentaje de Materia Seca

En cuanto al porcentaje de Materia seca se encontraron diferencias significativas para Materia seca de raíz ($F_{6,62}=13.60$; $p=0.0016$), tallo ($F_{6,62}=17.05$; $p=0.0007$) y total ($F_{6,62}=26.57$; $p=0.0012$) (Tabla 6).

Tabla 6

Promedio \pm error estándar del % de materia seca (MS) de Rubus glaucus Benth tratadas con diferentes quelatos de Fe

Tratamientos	%MS Raíz	%MS Planta	%MS Total
T0	10.44 \pm 0.36 a	11.52 \pm 0.15 a	8.71 \pm 0.38 a
T1	11.80 \pm 0.37 a	18.08 \pm 0.31 d	18.05 \pm 0.93 b
T2	12.15 \pm 0.45 a	18.73 \pm 0.41 d	19.20 \pm 1.48 c
T3	16.84 \pm 0.87 b	16.35 \pm 0.31 c	16.94 \pm 1.18 b
T4	14.21 \pm 0.52 b	20.08 \pm 0.20 e	25.30 \pm 3.42 cd
T5	12.95 \pm 0.35 a	14.50 \pm 0.23 b	21.03 \pm 0.95 bc
T6	17.80 \pm 0.80 c	20.99 \pm 0.11 e	27.81 \pm 1.96 d

Nota. T0: sin producto, T1: EDTA con dosis de 2.5 mg. L⁻¹, T2: EDTA con dosis de 5 mg. L⁻¹, T3: EDTA con dosis de 10 mg. L⁻¹, T4: EDDHA con dosis de 2.5 mg. L⁻¹, T5: EDDHA con dosis de 5 mg. L⁻¹, T6: EDTA con dosis de 10 mg. L⁻¹, medias con letra diferente son significativamente diferentes ($p>0.05$). Autoría propia.

En el porcentaje de materia seca de raíz, las dosis de 10 mg. L⁻¹ de Fe-EDDHA y 5 mg. L⁻¹ de Fe-EDDHA, tuvieron mayor porcentaje con 17.80 \pm 0.80 y 16.84 \pm 0.35 respectivamente con respecto a los otros tratamientos.

El porcentaje de materia seca del tallo aumentó con la aplicación de Fe-EDDHA con dosis de 2.5 mg. L⁻¹ y 10 mg. L⁻¹, con promedios de 20.08 \pm 0.20 y 20.99 \pm 0.11, respectivamente, a diferencia del resto de los tratamientos.

Con respecto al porcentaje de materia seca total, los tratamientos T4 (2.5 mg. L⁻¹ de Fe-EDDHA) y T6 (10 mg. L⁻¹ de Fe-EDDHA) obtuvieron porcentajes de 25.30 ± 3.42 y 27.81 ± 1.96 respectivamente, siendo estos mayores a los otros tratamientos.

Clorofila A, B y Total.

En la cantidad Clorofila Total ($F_{6,20}=46.3$; $p=0.0011$), Clorofila A ($F_{6,20}=24.34$; $p=0.002$) y Clorofila B ($F_{6,20}=13.7$; $p=0.0015$) se encontraron diferencia significativa (Tabla 7).

Tabla 7

Promedio ± error estándar de clorofila Rubus glaucus Benth tratadas con diferentes quelatos de Fe

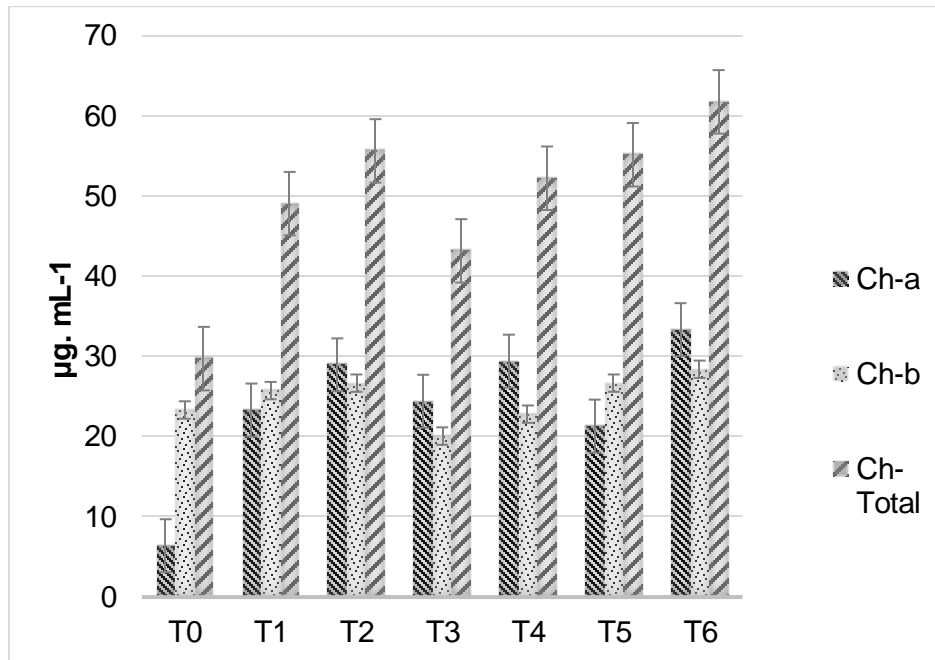
Tratamientos	Ch-a (µg. mL ⁻¹)	Ch-b (µg. mL ⁻¹)	Clorofila Total (µg. mL ⁻¹)
T0	6.41 ± 0.02 a	23.34 ± 0.05 a	29.75 ± 0.05 a
T1	23.33 ± 0.02bc	25.76 ± 0.03 b	49.08 ± 0.05 b
T2	28.97 ± 0.01d	26.69 ± 0.05 b	55.66 ± 0.05 d
T3	24.43 ± 0.03c	20.09 ± 1.37 a	44.19 ± 0.03 b
T4	29.43 ± 0.03d	22.82 ± 0.01 a	52.25 ± 0.03 c
T5	21.33 ± 1.34b	26.69 ± 0.79 b	47.18 ± 0.54 cd
T6	33.36 ± 0.03e	28.42 ± 0.05 c	61.78 ± 0.04 d

Nota. T0: sin producto, T1: EDTA con dosis de 2.5 mg. L⁻¹, T2: EDTA con dosis de 5 mg. L⁻¹, T3: EDTA con dosis de 10 mg. L⁻¹, T4: EDDHA con dosis de 2.5 mg. L⁻¹, T5: EDDHA con dosis de 5 mg. L⁻¹, T6: EDDHA con dosis de 10 mg. L⁻¹, A: Absorción, Ch-a: Clorofila a, Ch-b: Clorofila b, medias con letra diferente son significativamente diferentes ($p>0.05$). Autoría propia.

Para la concentración de clorofila Total, clorofila A, y clorofila B, resultado que el tratamiento T6 (10 mg. L⁻¹ de Fe-EDDHA) tuvo los mejores promedios de concentración: 61.78 µg. mL⁻¹, 61.7833.36 µg. mL⁻¹, 28.42 µg. mL⁻¹, respectivamente.

Figura 6

Cantidad de clorofila A (Ch-a), clorofila B (Ch-b) y clorofila Total (Ch-Total) para mora (Rubus glaucus Benth var. colombiana sin espinas)



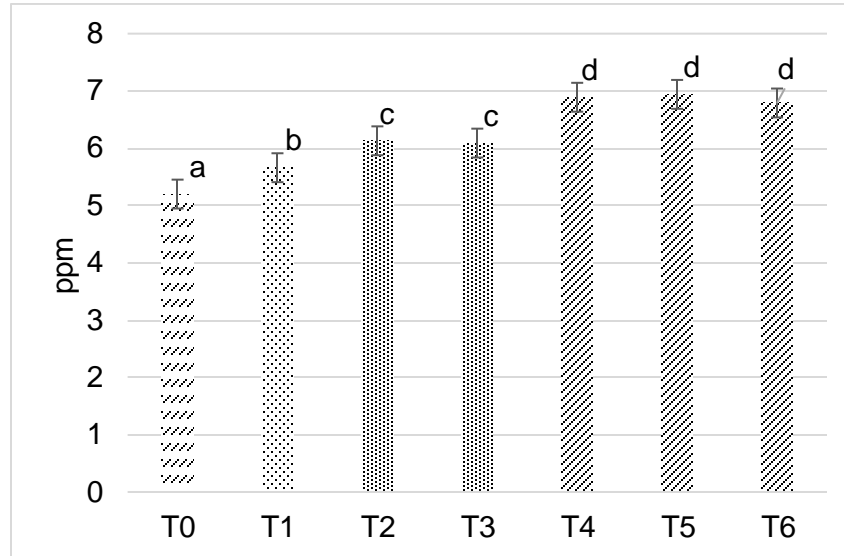
Nota: T0: sin producto, T1: EDTA con dosis de 2.5 mg. L⁻¹, T2: EDTA con dosis de 5 mg. L⁻¹, T3: EDTA con dosis de 10 mg. L⁻¹, T4: EDDHA con dosis de 2.5 mg. L⁻¹, T5: EDDHA con dosis de 5 mg. L⁻¹, T6: EDDHA con dosis de 10 mg. L⁻¹; Ch-a: Clorofila A, Ch-b: Clorofila B.

Hierro biodisponible (Fe²⁺)

El promedio de contenido de Fe²⁺ en las plantas de mora de castilla *Rubus glaucus* Benth presentaron diferencias significativas ($F_{6,20}=13.27$; $p=0.0009$). Los tratamientos con dosis de 2.5, 5 y 10 de Fe-EDDHA obtuvieron los mayores resultados a diferencia de los tratamientos con EDTA y el testigo (Figura 7).

Figura 7

Cantidad de hierro biodisponible (Fe^{2+}) en plantas de *Rubus glaucus*



Nota: T0: sin producto, T1: EDTA con dosis de 2.5 mg. L⁻¹, T2: EDTA con dosis de 5 mg. L⁻¹, T3: EDTA con dosis de 10 mg. L⁻¹, T4: EDDHA con dosis de 2.5 mg. L⁻¹, T5: EDDHA con dosis de 5 mg. L⁻¹, T6: EDDHA con dosis de 10 mg. L⁻¹. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Autoría propia.

Discusión

En estudio con *Rubus idaeus* (frambuesa roja), se obtuvieron mejores resultados en aclimatación con Fe-EDDHA que con Fe-EDTA, y que el contenido de clorofila fue mayor, con un enraizamiento temprano y abundante de 8,7 mm frente a 5,3 mm de largo de raíz, 30% más de peso fresco y seco, y consecuencia de ello microplantas de mayor calidad, Zawadzka & Orlikowska, (2006); coincidiendo con esta investigación, ya que las plantas tratadas con 10 mg L⁻¹ de FeDDHA (T6) tuvieron raíces con mayor longitud (57.90 mm), tallos más largos (76.20mm) y aumentó la cantidad de hojas (13,56) a comparación de las plantas tratadas con 10 mg. L⁻¹ de Fe-EDTA cuyos valores fueron de 57,3 mm en longitud de raíz, 57,03 mm de tallo y una cantidad de hojas de 10.89.

Por otro lado, Van der Salm *et al.* (1994), en su estudio acerca de la importancia de los quelatos de hierro en *Rosa híbrida* L. señalan que la sustitución de Fe-EDTA por Fe-EDDHA en medio MS dio lugar al desarrollo de brotes verdes con mayor longitud (24 mm) y contenido de clorofila (2,40 mg g⁻¹ FW) y de hierro, mientras que el Fe-EDTA resultó con brotes de 17mm y una cantidad de clorofila de 1.43 mg g⁻¹ FW, confirmando los resultados obtenidos en esta investigación, ya que al agregar Fe- EDDHA al medio MS líquido para enraizamiento *ex vitro* y en sustrato, se obtuvieron plantas con mayor longitud de tallo (Tabla 5), concentración de hierro (Figura 5) y clorofila total (figura 4), Zawadzka & Orlikowska (2006); de la misma forma, Trejgell *et al.* (2012), en su investigación acerca del efecto de dos quelatos de hierro en el contenido de clorofila y el enraizamiento de *Carlina onopordifolia*, señala que al suplementar el medio MS con Fe-EDDHA como fuente de Fe, se produjo un aumento significativo en el nivel de clorofila en las hojas.

Con respecto al porcentaje de materia seca, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con Fe-EDDHA y Fe-EDTA. Las plantas que contenían 10 mg. L⁻¹ de Fe-EDDHA obtuvieron mayor porcentaje de materia seca con 27.81%, datos que concuerdan con Ortega & Molina (2007), en la cual, las plantas de sorgo tratadas con 184 µmol L⁻¹ de FeEDDHA presentaron la producción más alta de materia seca.

Fe-EDDHA tiene una gran estabilidad que permite la adquisición de hierro y el mantenimiento de un equilibrio iónico constante en el medio, Chrysovalantou *et al.* (2007). Es un quelato estable, ya que no interfiere con el metabolismo de la auxina y no produce especies reactivas de oxígeno, Zawadzka & Orlikowska (2009).

La eficiencia de la aclimatación depende de qué tan fuerte esté la planta para poder transformarse en organismo autótrofo, Ruíz *et al.* (2018). Cuanto mayor es el número y la madurez de raíces, más eficaz es la absorción de agua, Jones & Flores (2007).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- El enraizamiento y la aclimatación de *Rubus glaucus* Benth, en un medio a base de MS líquido que contiene quelato de Fe-EDDHA, mejoro la calidad de las plantas en la fase de enraizamiento *ex vitro* y aclimatación. El rendimiento de las plantas aclimatadas puede mejorarse sustituyendo el quelato Fe-EDTA por el quelato Fe- EDDHA.
- La concentración de 10 mg. L⁻¹ de EDDHA (T6), permitió mejorar las variables morfológicas de la planta como: número de hojas (13.56), longitud de raíz (57.90 mm) y planta (76.20 mm) en comparación con el testigo (largo de raíz: 12.98 mm, largo de planta: 52.87 mm y numero de hojas: 7.44), y 10 mg. L⁻¹ de EDTA (T4) (largo de raíz: 47.03 mm, largo de planta: 57.03 mm y numero de hojas: 10.89), cuanto mayor es el número y la madurez de raíces, más eficaz es la absorción de agua.
- Las plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), que se desarrollaron en Medio MS líquido con adición de Fe-EDDHA obtuvieron mayor cantidad de clorofila (61.78 µg. mL⁻¹) y hierro biodisponible (6.79 ppm).

Recomendaciones

- Se recomienda sustituir el Fe-EDTA por dosis de 10 mg. L⁻¹ de Fe-EDDHA (T6), ya que mejorará el porcentaje de enraizamiento y aclimatación de plantas *ex vitro*.
- Realizar un seguimiento en las plantas con quelato de Fe-EDDHA para evaluar su respuesta ante la clorosis férrica.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, A. F., Abadía, A., & Abadía, J. (2006). Evaluación química y agronómica de quelatos de hierro sintéticos. *Vida Rural*, 20. <https://www.researchgate.net/publication/28281699>
- Antonopoulou, C., Dimassi, K., Therios, I., Chatzissavidis, C., & Papadakis, I. (2007). The effect of Fe-EDDHA and of ascorbic acid on *in vitro* rooting of the peach rootstock GF-677 explants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(6), 559-561. <https://doi.org/10.1007/s11738-007-0067-9>
- Barra, R. F. Z. (2018). *Efecto de vivianita versus quelato de hierro EDDHA, sobre la disponibilidad de hierro activo en suelos caláreos, para disminuir el problema de clorosis férrica*. [Tesis de Pregrado, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso] Valparaíso, Chile. <http://repositorio.ucv.cl/handle/10.4151/78805>
- Bernal, J., & Díaz, C. (2006). Materiales locales y mejorados de Tomate de árbol, mora y lulo, sembrados por los agricultores y cultivares disponibles para su evaluación en Colombia. En *Tomate de Arbol, Mora y Lulo*. <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/1225>
- Betancour, J. E. V., & Rojas, M. G. C. (2011). *Rizogénesis in vitro a partir de yemas de Polylepsis incana Kunth., y Polylepsis pauta Hieron., con la ulterior determinación de la especie variable para crecimiento in situ en la zona de Papallacta* [Tesis de Pregrado, Universidad Politécnica Salesiana] Quito, Ecuador. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/3598>
- Bolaños, M. M. B., Cardona, W. A., García, M. C. M., Zapata, Y. A. N., Vásquez, R. E. R., Martínez, E. P., Hio, J. C., Ortega, N. C. F., Peña, A. C. H., Bautista, L. G., & López, D. A. M. (2020). *Mora (Rubus glaucus Benth.): Manual de recomendaciones técnicas para su cultivo en el departamento de Cundinamarca*. (L. G. Bautista & A. C. Montoya, Eds.; CTA-2). Universidad Nacional de Colombia. <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.es>

- Bonilla, W. (2013). *Escarificación química de la semilla de mora de castilla (Rubus glaucus Benth) variedad colombiana sin espinas* [Tesis de Pregrado, Universidad Técnica de Ambato] Ambato, Ecuador.
<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3946/1/Tesis-40agr.pdf>
- Broome, O. C., & Zimmerman, R. H. (1978). *In vitro* Propagation of Blackberry. *American Society for Horticultural Science*, 13(2), 199-204.
<https://doi.org/https://doi.org/10.21273/HORTSCI.13.2.151>
- Cancino, G. O., Quevedo, E., Villamizar, C. E., & 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 Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 7-15. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54262>
- Castillo, A. (2006). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*.
<http://www.inia.uy/publicaciones/documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf>
- Castro, J. J. R., & Cerdas, A. M. del M. (2005). *Mora (Rubus spp): Cultivo y manejo poscosecha*. (G. M. Gutiérrez, F. B. Mojica, & L. R. Cartín, Eds.; MAG).
<http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-8862.pdf>
- Cerdás, María del Mar Sala. (2003). *Estabilidad de los isómeros de FeEDDHA y FeEDDHMA en diferentes medios nutritivos* [Tesis posgrado, Universidad de Alicante] Alicante, España.
https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiQ3qSGk_b8AhWUSzABHesSCdgQFnoECAoQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.cervantesvirtual.com%2FdescargaPdf%2Festabilidad-de-los-isomeros-de-feeddha-y-feeddhma-en-diferentes-medios-nutritivos--0%2F&usg=AOvVaw0MOKDCc659xym97ckvEOf0
- Chrysovalantou, A., Kortessa, D., Therios, & Chatzissavidis, C. (2007). The effect of Fe-EDDHA and of ascorbic acid on *in vitro* rooting of the peach rootstock GF-677 explants.

Acta Physiologiae Plantarum, 29, 559-561. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11738-007-0067-9>

Delgado, F. D. (2012). *Manejo orgánico del cultivo de mora (Rubus sp.)* [Tesis de pregrado, Universidad de Cuenca] Cuenca, Ecuador.

<https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3074/1/mag129.pdf>

Franco, A. D., Ramírez, M. E., & Cháirez, F. E. O. (2018). Correction of iron chlorosis with chelate EDDHA in crops grown in alkaline and calcareous soil. *Terra Latinoamericana*, 36(1), 13-22. <https://doi.org/10.28940/terra.v36i1.254>

Franco, G., Bernal, J. A., Cipriano, E., Díaz Díez, A., Tamayo Vélez, Á., Julián, P., Molano, T., Orrego, C. E., Salgado, N., Lady, A., Yeimy, J. R., Rodríguez, A., Díaz, J., María, M., García Muñoz, C., Andrés, G., Arango, A., Humberto, J., Cárdenas, A., ... Estrada, B. (2020). *Tecnología para el cultivo de la mora (Rubus glaucus Benth.) Colección Transformación del Agro (AGROSAVIA)*.

<https://editorial.agrosavia.co/index.php/publicaciones/catalog/book/46>

Galarza, D., Garcés, S., Velásquez, J., Sánchez, V., & Zambrano, J. (2016). *El cultivo de mora en el Ecuador*. (G. Ayala, V. Freire, & A. Gonzalez, Eds.; INIAP).

<https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/4878>

Galvez, F. B. (2009). *Biofortificación de deis accesiones promisorias y la variedad INIAP-450 de chocho Lupinus mutabilis Sweet mediante la aplicación de quelatos de hierro y zinc* [Tesis pregrado, Universidad de las Fuerzas Armadas] Sangolqui, Ecuador.

<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/15927/1/T-IASA%20I-005487.pdf>

Gil, A. E., López, E. S., & López, A. (2017). Aclimatación de plántulas *in vitro* de *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. (Gesneriaceae) "violeta africana" a condiciones de invernadero.

Arnaldoa, 24(1). <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.241.24116>

González, C. Y., Manzano, D. O., & García, H. O. (2019). Puntos críticos de la cadena productiva de la mora (*Rubus glaucus* Benth), en el municipio de Pamplona, Colombia.

Revista de Investigación, Desarrollo e Innovación, 10(1), 9-22.

<https://doi.org/10.19053/20278306.v10.n1.2019.10008>

Grijalba, C. M., Calderón, L. A., & Pérez, M. M. (2010). Rendimiento y calidad de la fruta en mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), con y sin espinas, cultivada en campo abierto en Cajicá (Cundinamarca, Colombia). *Facultad de Ciencias Básicas*, 6(1), 24-41.

<https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb/article/view/2079#:~:text=El%20porcentaje%20de%20la%20producción,35%2C45%25%20para%20pérdidas.>

Guijarro, J. D., & Bermúdez Bellido. (2003). *Estabilidad de los isómeros de FeEDDHA y FeEDDHMA en diferentes medios nutritivos* [Tesis de Doctorado, Universidad de Alicante] Alicante, España.

<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjNhfYTgff8AhXCSDABHaKEAa8QFnoECAgQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.cervantesvirtual.com%2FdescargaPdf%2Festabilidad-de-los-isomeros-de-feeddha-y-feeddhma-en-diferentes-medios-nutritivos--0%2F&usg=AOvVaw0MOKDCc659xym97ckvEOfo>

Hunková, J., Libiaková, G., Fejér, J., Vujović, T., & Gajdošová, A. (2018). Testing of different iron sources and concentrations on shoot multiplication of blackberry (*Rubus fruticosus* L.). *Genetika*, 50(1), 351-356. <https://doi.org/10.2298/GENSR1801351H>

Iza, M. E. Y. (2018). *Diferenciación morfoagronómica de seis cultivares de mora (Rubus glaucus Benth) en el valle de Tumbaco* [Tesis de Pregrado, Universidad Central del Ecuador] Quito, Ecuador. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/15161>

Jomaa, A. B. L. (2002). *Clorosis férrica: respuestas de las plantas y métodos de corrección* [Tesis de Doctorado, Universidad de Lleida] Lleida, España.

<https://digital.csic.es/handle/10261/9606>

Jones, F., & Flores, D. (2007). Establecimiento *in vitro* y pruebas preliminares de micropropagación en medio semisólido de líquido de frambuesa (*Rubus idaeus* L.).

Tecnología En Marcha, 20(3).

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjQo4-Qgfr8AhWzVTABHTsKD1QQFnoECAwQAQ&url=https%3A%2F%2F Dialnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F4835840.pdf&usg=AOvVaw0u1fwRQFE_TfHl5KzhpC8U

Kodym, A., & Zapata, F. J. A. (2001). Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66, 67-71.

https://www.researchgate.net/publication/325265014_Testing_of_different_iron_sources_and_concentrations_on_shoot_multiplication_of_blackberry_Rubus_fruticosus_L

Kyrkby, E., & Römheld, V. (2007). Micronutrientes en la fisiología de las plantas: funciones, absorción y movilidad. *The International Fertilizer Society*.

<https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/MicronutrientesenlaFisiologia.pdf>

Lucena, J. J. (2009). El empleo de complejantes y quelatos en la fertilización de micronutrientes. *Ceres*, 56(4), 527-535. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=305226808020>

MAG. (2022). *Mora de Castilla*. www.agricultura.gob.ec/dia-de-campo-en-mora-de-castilla-organiza-el-iniap/

Marulanda, M. L., Carvajalino, M., & Vento, H. (2017). Establecimiento y multiplicación *in vitro* de plantas seleccionadas de *Rubus glaucus* Benth para el departamento de Risaralda (Colombia). *Actualidades Biológicas*, 22(73), 121-129.

<https://doi.org/10.17533/udea.acbi.329625>

Metroflor-agro. (2022, enero 13). *Manejo de clorosis férrica mediante nuevos quelatos vegetales -carboxipoliolés- Ingeplant en rosa (Rosa sp) en la Sabana de Bogotá | Metroflor*.

<https://www.metroflorcolombia.com/manejo-de-clorosis-ferrica-mediante-nuevos-quelatos-vegetales-carboxipoliolés-ingeplant-en-rosa-rosa-sp-en-la-sabana-de-bogota/>

Molassiotis, A., & Dimassi, K. (2003). Fw-EDDHA promotes rooting of rootstock GF-677 (*Prunus amygdalus* x *P. persica*) explants *in vitro*. *Biologia Plantarum*, 47(1), 141-144.

https://www.researchgate.net/publication/248761162_Fe-

EDDHA_Promotes_Rooting_of_Rootstock_GF677_Prunus_amygdalus_P_persica_Explants_in_vitro

Ortega, R., & Molina, M. (2007). Comparación entre sulfatos y compuestos quelados como de zinc y hierro en suelos calcáreos. *Agrociencia*, 41(5).

<https://www.redalyc.org/pdf/302/30241501.pdf>

Petruzzi, H. J., Stritzler, N. P., Ferri, C. M., Pagella, J. H., & Rabotnikof, C. M. (2005).

Determinación de materia seca por métodos indirectos: utilización del horno a microondas [Tesis pregrado, Universidad Nacional de la Pampa] Pampa, Argentina. https://produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pastoreo%20sistemas/43-uso_microondas_ms.pdf

Roveda, G., Cabra, L., Ramírez, M. M., & Peñaranda, A. (2007). Efecto de las micorrizas arbusculares sobre la aclimatación y endurecimiento de microplántulas de mora (*Rubus glaucus*). *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 8(1), 28-36.

<https://revistacta.agrosavia.co/index.php/revista/article/view/80>

Ruíz, A. T., Martínez, J. A., Carrillo, T., Parra, R. Á., Ojeda, D. L., & Hernández, A. R. (2018).

Establecimiento *in vitro* de dos cultivares liberados de frutillas: fresa y frambuesa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(4), 799-812.

<https://doi.org/10.29312/remexca.v9i4.1397>

Sanz, E. M., & Montañés, G. L. (1997). Diagnóstico visual de clorosis férrica. *ITEA*, 93(1), 7-22.

<https://digital.csic.es/handle/10261/13790>

Shibli, R. A., Mohammad, M. J., & Ajlouni, Z. I. (2002). Growth and micronutrient acquisition of *in vitro* grown bitter almond and sour orange in response to iron concentration from different

iron chelates. *Journal of Plant Nutrition*, 25(7), 1599-1606. <https://doi.org/10.1081/PLN-120005410>

- Sokolov, R. S., Atanassova, B. Y., & Iakimova, E. T. (2015). Influence of Iron Sources in the Nutrient Medium on *in vitro* Shoot Multiplication and Rooting of Magnolia and Cherry Plum. *Journal of Horticultural Research*, 23(2), 27-38. <https://doi.org/10.2478/johr-2015-0014>
- Solís, J. V. S. (2019). *Estandarización del protocolo de micropropagación in vitro de frambuesa (Rubus rosifolius Sm.) a partir de meristemas axilares* [Tesis de Pregado, Universidad Técnica de Ambato] Ambato, Ecuador.
<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/30460/1/BQ%20201.pdf>
- Trejjell, A., Libront, I., & Tretyn, A. (2012). The effect of Fe-EDDHA on shoot multiplication and *in vitro* rooting of *Carlina onopordifolia* Besser. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(5), 2051-2055. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1000-4>
- Vaca, I. de los Á. S. (2012). *Regeneración de plantas completas de Rubus glaucus (Benth), mediante el uso de reguladores de crecimiento*. [Tesis de Posgrado, Escuela Superior Politécnica del Litoral] Guayaquil, Ecuador.
<https://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/25141>
- Vaca, I., & Landázuri, P. (2013). EVALUATION OF THREE LEVELS OF NITROGEN IN CULTURE MEDIUM, IN *in vitro* ROOTING AND ADAPTATION TO SUBSTRATE PHASES OF *Rubus Glaucus* (Benth). *La Granja*, 18(2), 48-54.
<https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/8841>
- van der Salm, T. P. M., van der Toom, C. J. G., Hiinisch, C. H., Dubois, L. A. M., de Vries, D. P., & Dons, H. J. M. (1994). Importance of the iron chelate formula for micropropagation of *Rosa hybrida* L. «Moneyway». *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37, 73-77.
<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00048120>
- Villegas, C., & Albarracín, W. (2016). Edible coating application and effect on blackberry (*Rubus glaucus* Benth) shelf life. *Vitae*, 23(3), 202-209.
<https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v23n3a06>

Yépez, D. E. T. (2018). *Evaluación de un método no destructivo para determinar contenido de nitrógeno foliar en Fragaria vesca variedad: festival*. [Tesis pregrado, Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE] Sangolquí, Ecuador.

<http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/15844?locale-attribute=de>

Zawadzka, M., & Orlikowska, T. (2006). The influence of FeEDDHA in red raspberry cultures during shoot multiplication and adventitious regeneration from leaf explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85(2), 145-149. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-9063-1>

Zawadzka, M., & Orlikowska, T. (2009). Influence of FeEDDHA on *in vitro* rooting and acclimatisation of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) in peat and vermiculite. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 84(6), 599-603.

<https://doi.org/10.1080/14620316.2009.11512572>