

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA**  
**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA  
OBTENCIÓN DE PROEMBRIONES A PARTIR DE CALLOS  
DESARROLLADOS DE TEJIDO FOLIAR DE VITROPLANTAS DE  
MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus Benth*).**

**Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:**

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ELABORADO POR:**

**ANDREA CAROLINA ALULEMA FLORES**

**SANGOLQUÍ, 2013**

# **HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

## **ELABORADO POR**

---

Andrea Carolina Alulema Flores

## **COORDINADOR DE LA CARRERA**

---

Ing. Grace Tatiana Páez M.Sc.

## **SECRETARIO ACADÉMICO**

---

Abg. Carlos Orozco Bravo M.Sc.

Sangolquí, de Mayo del 2013

## **CERTIFICACIÓN**

**Certifico:**

Que el trabajo titulado, “**Establecimiento de un protocolo para la obtención de proembriones a partir de callos desarrollados de tejido foliar de vitroplantas de mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*)**” realizado por Andrea Carolina Alulema Flores, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

10 de Mayo del 2013

---

**Dr. Darwin Rueda**

DIRECTOR

---

**Ing.-Mat. Pedro Romero Saker**

CODIRECTOR

## **DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD**

Andrea Carolina Alulema FLores

### **Declaro que:**

El proyecto de grado denominado, “**Establecimiento de un protocolo para la obtención de proembriones a partir de callos desarrollados de tejido foliar de vitroplantas de mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*)**”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

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

Sangolquí, 10 de Mayo del 2013

---

**Andrea Carolina Alulema Flores**



## AUTORIZACIÓN

Yo, Andrea Carolina Alulema Flores

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo, **“Establecimiento de un protocolo para la obtención de proembriones a partir de callos desarrollados de tejido foliar de vitroplantas de mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*)”**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 10 de Mayo del 2013

---

Andrea Carolina Alulema Flores

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a Dios,

Que por su inmenso amor, misericordia y paciencia me dio las fuerzas para culminar de la mejor manera.

A mi familia que de igual forma siempre estuvieron ahí en todo momento y en especial en los difíciles dándome todo su apoyo, cariño y amor.

**Andrea Carolina Alulema Flores**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco en primer lugar al todopoderoso a nuestro Señor que él me dio toda la fuerza para siempre salir adelante con su santa bendición y a mi madre la Santísima Virgen María.

Agradezco a mis padres y hermanos que siempre estuvieron ahí apoyándome, dándome ánimos para cumplir con éxito mis estudios y en especial por su paciencia que me han tenido en todo este tiempo.

Agradezco a todos mis amigos y amigas que siempre estuvieron brindándome su apoyo en las buenas y en especial en las malas y con los cuales compartí chéveres momentos en toda la carrera y nunca me dejaron sola.

Al Dr. Darwin Rueda O., Director y al Ing.-Mat. Pedro Romero S., Codirector del Tema de Tesis desarrollado, quienes con todos sus conocimientos me han sabido guiar de la mejor manera para que el mismo culmine de manera exitosa.

Agradezco por toda la colaboración y el apoyo que me brindaron para la realización de este proyecto y ante mi persona al Ing. César Falconí MsC, Lic. Marco Taco, Ing. Daysi Muñoz, Ing. Pablo Landazuri, Quim. Jaime Gia e Ing. Juan Tigreiro, Personal docente e Investigadores del Instituto Agropecuario Superior Andina IASA I.

**Andrea Carolina Alulema Flores**

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO	Pág.
HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS .....	II
CERTIFICACIÓN .....	III
DEDICATORIA.....	VI
AGRADECIMIENTOS .....	VII
ÍNDICE DE CUADROS .....	XII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XIII
ÍNDICE DE TABLAS .....	XV
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	XVI
ÍNDICE DE ANEXOS .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
RESUMEN.....	XVII
ABSTRACT.....	XVIII
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación e importancia del problema a resolver.....	3
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 Objetivo general del proyecto.....	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	4
1.4 Hipótesis.....	5
CAPÍTULO II.....	6
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 <i>Rubus glaucus Benth</i> , mora de castilla.....	6

2.1.1	Origen y generalidades .....	6
2.1.2	Taxonomía .....	7
2.1.3	Características botánicas .....	7
2.1.4	Distribución geográfica .....	8
2.1.5	Importancia económ .....	8
2.1.6	Sistemas de propagación .....	9
2.1.6.1	Acodo .....	9
2.1.6.2	Estaca .....	10
2.1.6.3	Cultivo <i>in vitro</i> .....	10
2.2	Embriogénesis somática.....	10
2.2.1	Embriogenesis directa .....	11
2.2.2	Embriogenesis indirecta .....	12
2.2.2.1	Callo .....	13
2.3	Suspensión celular .....	14
2.3.1	Tipos de sistemas.....	14
2.3.2	Dinámica de crecimiento celular.....	15
2.4	Bioreguladores.....	16
2.4.1	Generalidades .....	16
2.4.2	Clasificación .....	16
CAPÍTULO III.. .....		18
MATERIALES Y MÉTODOS .....		18
3.1	Participantes.....	18
3.2	Zona de estudio.....	18
3.2.1	Ubicación política .....	18
3.2.2	Ubicación geográfica .....	19
3.2.3	Ubicación ecológica.....	19

3.2.4	Condiciones de laboratorio.....	20
3.3	Etapa de obtención del material vegetal.....	20
3.4	Etapa de inducción a callo embriogénico .....	21
3.4.1	Primera fase:.....	21
3.4.1.1	Diseño estadístico .....	23
3.4.1.2	Variables evaluadas .....	25
3.4.1.3	Características de la unidad experimental.....	25
3.4.2	Segunda fase: .....	25
3.4.2.1	Diseño estadístico .....	26
3.4.2.2	Variables evaluadas .....	27
3.4.2.3	Características de la unidades experimentales .....	30
3.5	Etapa de cultivo de células en suspensión .....	30
3.4.1	Diseño estadístico .....	33
3.4.2	Variables evaluadas .....	33
3.4.3	Características de la unidades experimentales .....	34
CAPÍTULO IV.....		35
RESULTADOS.....		35
4.1.	Inducción a callo (callogénesis).....	35
4.1.1	Primera fase.....	35
4.1.2	Segunda fase .....	38
4.2.	Suspensión celular. ....	41
CAPÍTULO V.....		45
DISCUSIÓN.....		45

CAPÍTULO VI.....	49
CONCLUSIONES.....	49
CAPÍTULO VII.....	50
RECOMENDACIONES .....	50
CAPÍTULO VIII.....	51
BIBLIOGRAFÍA .....	51

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 4.1:</b> Análisis de varianza para el número de callos en medio de inducción con auxinas, IASA I, Ecuador, 2013.....	37
<b>Cuadro 4.2:</b> Prueba de Duncan, IASA I, Ecuador, 2013. ....	37
<b>Cuadro 4.3:</b> Análisis de varianza para el tamaño de callos en medio de crecimiento con citoquininas, IASA I, Ecuador, 2013.....	38
<b>Cuadro 4.4:</b> Prueba de Duncan, IASA I, Ecuador, 2013. ....	39
<b>Cuadro 4.5:</b> Prueba de Kruskal Wallis, IASA I, 2013. ....	43



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	Pág.
<b>Figura 2.1:</b> Mora de castilla, <i>Rubus glaucus Benth.</i> ....	8
<b>Figura 2.2:</b> Sistema de reproducción vegetativa de la mora de castilla. ....	9
<b>Figura 2.3:</b> Propagación vegetativa por embriogénesis somática. ....	11
<b>Figura 2.4:</b> Vías de multiplicación en cultivos <i>in vitro.</i> ....	12
<b>Figura 2.5:</b> a) Aparición de callo, b) Callo de 4 semanas. ....	13
<b>Figura 2.6:</b> Establecimiento del cultivo de células en suspensión. ....	14
<b>Figura 2.7:</b> Curva de crecimiento de las células en un cultivo en suspensión. ....	16
<b>Figura 3.1:</b> Fotografía satelital, IASA I, Ecuador, 2012. ....	19
<b>Figura 3.2:</b> Mapa preliminar de la hacienda El Prado. ....	20
<b>Figura 3.3:</b> Fase de multiplicación de mora de castilla. ....	21
<b>Figura 3.4:</b> a) Cortes en las nervaduras de la hoja. b) Siembra de las hojas de mora. c) Cajas Petri con medio de inducción. ....	22
<b>Figura 3.5:</b> a) Medios de inducción en cámara oscura, b) Cámara oscura. ....	23
<b>Figura 3.6:</b> Tratamientos en medio de inducción. ....	24
<b>Figura 3.7:</b> Introducción de callo a medio con citoquininas. ....	26
<b>Figura 3.8:</b> Tratamientos en medio con citoquininas. ....	26
<b>Figura 3.9:</b> Toma de medidas del callo a) Con regla, b) Con micrómetro en el estéreo microscopio. ....	28
<b>Figura 3.10:</b> a) Introducción de callos friables a medio de cultivo con GA <sub>3</sub> . b) Callos en medio de cultivo de multiplicación. ....	31
<b>Figura 3.11:</b> Agitador incubador. ....	31
<b>Figura 3.12:</b> Recuento celular. a) Toma de muestra y cámara de Neubauer, b) Visualización en el microscopio. ....	32

<b>Figura 4.1:</b>	Cultivo celular.....	35
<b>Figura 4.2:</b>	Inducción a callo a) A la primera semana, b) A la cuarta semana. ....	36
<b>Figura 4.3:</b>	Crecimiento de callo en el T <sub>6</sub> a) A la segunda semana, b) A la tercera semana. ....	38
<b>Figura 4.4:</b>	Callos del T6 (MS+0,5ppm de Zeatine).....	40
<b>Figura 4.5:</b>	Desprendimiento celular. a) Células adheridas a los callos y inicio de desprendimiento. b) Células desprendidas.....	42
<b>Figura 4.6:</b>	Aglutinaciones celulares al quinto día. ....	42
<b>Figura 4.7:</b>	Microcallos. a) Observación microscópica, b) Observación macroscópica.....	44

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		Pág.
<b>Tabla 3.1:</b>	Concentraciones de 2,4D en medio MS, para la formación de callo embriogénico de <i>Rubus glaucus Benth.</i> .....	23
<b>Tabla 3.2:</b>	Concentraciones de ANA en medio MS para la formación de Callo embriogénico de <i>Rubus glaucus Benth.</i> .....	24
<b>Tabla 3.3:</b>	Concentraciones TDZ en medio MS, para la formación de callo embriogénico de <i>Rubus glaucus Benth.</i> .....	27
<b>Tabla 3.4:</b>	Concentraciones Zeatine en medio MS para la formación de Callo embriogénico de <i>Rubus glaucus Benth.</i> .....	27
<b>Tabla 3.5:</b>	Coloración de callos. IASA. 2013. ....	29
<b>Tabla 3.6:</b>	Concentraciones de GA3 en medio MS para la suspensión celular de <i>Rubus glaucus Benth.</i> .....	30
<b>Tabla 3.7:</b>	Concentraciones de GA3 en medio MS para la suspensión celular de <i>Rubus glaucus Benth.</i> .....	33
<b>Tabla 3.8:</b>	Datos obtenidos de números de callos durante 4 semanas. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Tabla 3.9:</b>	Datos obtenidos del tamaño de los callos.¡Error! Marcador no definido.	
<b>Tabla 3.10:</b>	Datos obtenidos de la colorimetría de los callos desde la quinta semana hasta la séptima semana.¡Error! Marcador no definido.	
<b>Tabla 3.11:</b>	Datos obtenidos del crecimiento celular.¡Error! Marcador no definido.	
<b>Tabla 3.12:</b>	Promedio por tratamiento del crecimiento celular¡Error! Marcador no definido.	

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO	Pág.
<b>Gráfico 4.1:</b> Tratamientos evaluados para el desarrollo de los callos en la fase de inducción .....	36
<b>Gráfico 4.2:</b> Tratamientos evaluados para el incremento de tamaño de los callos producidos en la fase 1. ....	40
<b>Gráfico 4.3:</b> Tipos de callos obtenidos en la fase de callogénesis. ....	41
<b>Gráfico 4.4:</b> Crecimiento celular en Medio MS+GA <sub>3</sub> . ....	43

## RESUMEN

La mora de castilla perteneciente a la familia *Rosáceae*, siendo originaria de las zonas tropicales de América y también creciendo en los andes ecuatorianos de forma individual o formando grupos con otras variedades.

Es una fruta que contiene gran cantidad de minerales y vitaminas especialmente la vitamina C por lo cual su consumo ha ido incrementándose aproximadamente en un 3% en los últimos años.

En los laboratorios de Biotecnología del IASA I se realizó la presente investigación para obtener proembriones a partir de callos desarrollados de tejido foliar de vitroplantas de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), en el cual consistió en probar cuatro diferentes concentraciones de auxinas (2,4 D y ANA), cuatro diferentes concentraciones de citoquininas (TDZ y Zeatine) y concentraciones de giberelinas ( $GA_3$ ), para establecer el protocolo adecuado.

En la fase de callogenesis con auxinas se obtuvo que la mejor concentración fue de 0,5ppm de 2,4 D con una aparición de 15 callos, ocupando el 100% del área foliar en un lapso de cuatro semanas, y la fase con citoquininas se obtuvo que la mejor concentración fue de 0,5ppm de Zeatine con un promedio de crecimiento de 0,5cm y por último en la suspensión celular con una concentración de 0,5ppm de  $GA_3$  se obtuvo una tasa de crecimiento promedio de 141 667 células/mL.

## ABSTRACT

The mora de castilla belonging to the family Rosaceae, being native to tropical America and growing in the Ecuadorian Andes individually or in groups with other varieties.

It is a fruit that contains a lot of minerals and vitamins especially vitamin C so its consumption has been increasing by about 3% in recent years.

In Biotechnology laboratories IASA I present investigation was carried out to obtain proembryos from callus developed from leaf tissue of plantlets of blackberry (*Rubus glaucus* Benth), which was to test four different concentrations of auxin (2, 4 D and NAA), four different concentrations of cytokinins (TDZ and Zeatine) and concentrations of gibberellin (GA3), to establish the appropriate protocol.

In phase callogenesis auxin was obtained that the best concentration was 0.5 ppm to 2.4 D with an onset of 15 calluses, occupying 100% of the leaf area in a span of four weeks, and phase with cytokinins are obtained that the best concentration was 0.5 ppm Zeatine with an average growth of 0.5 cm, and finally to the cell suspension with a concentration of 0.5 ppm of GA3 was obtained average growth rate of 141 667 cells / mL .

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

*Rubus glaucus Benth*, conocida como mora de castilla o mora azul, es de gran importancia comercial, ha sido cultivada en el país por más de siete décadas en regiones donde la altitud va de 1.200 a 3.000 m.s.n.m. (AgriFoodGateway [en línea]).

La producción nacional de mora registra una expansión constante, actualmente se cultiva en los valles del callejón interandino y en las estribaciones de la sierra, principalmente encontrándose en las provincias de Tungurahua, Cotopaxi, Carchi, Imbabura, Pichincha y Bolívar.

Las variedades comúnmente empleadas en estas zonas corresponden a la mora de castilla y a la mora brazos. La primera se cultiva mayoritariamente en una extensión de más de 5200 hectáreas con una producción de entre 12 a 14 toneladas al año, lo que llega a abastecer el mercado nacional pero no es suficiente para el mercado externo (Prieto. 2010).

El Ecuador, en el año 2008, exportó 22 500 dólares de mora de castilla para el mercado en fresco, que corresponden a 11,93 toneladas, cuyos principales destinos fueron EEUU, España, Antillas Holandesas y Alemania (Montalvo, 2010).

Actualmente en el país se ha registrado un incremento del 3% en el consumo de mora de castilla por su adaptabilidad en la elaboración de conservas, así como por su aceptación para consumirla en fresco. Según los pequeños productores, los cultivos se manejan por el número de plantas que puede variar entre 150 y 6000 (Prieto. 2010).

Según Monteiro (2004), la mora es propagada por métodos vegetativos, tradicionalmente tiene dos sistemas: estaca y acodo, ambos métodos son más económicos y presentan mejores resultados que los obtenidos a través de semillas. Estos procedimientos son los que facilitan la diseminación de plagas, enfermedades que afectan la calidad y cantidad de la producción.

La propagación de vitroplantas es una técnica muy utilizada en cultivos de importancia económica. En España en 1.990 existían 28 laboratorios dedicados a la producción comercial de este tipo de plantas, especialmente por la rapidez con que se puede llegar a cultivar tejidos, órganos, semillas, embriones y obtener individuos seleccionados (Segretín, 2006).

Se han realizado algunas investigaciones acerca de micropropagación in vitro de la mora de castilla, sin embargo no existen estudios de suspensión celular a partir de tejido foliar.

Tomando en cuenta que en la actualidad algunos investigadores como Trang *et al.* (2000) reportan que el desarrollo de suspensiones de células embriogénicas abre la posibilidad para la producción masiva de plantas a bajo costo y con buenos resultados.



La presente investigación; busca también establecer un protocolo que permita la obtención de proembriones a partir de callos desarrollados de tejido foliar de vitroplantas de mora de castilla, *Rubus glaucus Benth.*

## **1.2 Justificación e importancia del problema a resolver.**

La mora de castilla es una de las frutas de clima frío que ha tenido un mejoramiento en su proyección en los últimos años, debido a la creciente demanda en el mercado nacional, al potencial para su exportación y a la continuidad de ingresos que su cultivo representa para el pequeño productor.

La micropropagación *in vitro* es parte de la modernización de la agricultura, la aplicación de estas técnicas contribuyen a mejorar las condiciones sanitarias de las plantaciones e incrementan su productividad. Por tanto representan un mejoramiento en el nivel de vida de productores y de la comunidad en general.

La optimización de protocolos para el cultivo celular partiendo de células somáticas ofrece grandes expectativas para el empleo de esta tecnología en procesos de mejoramiento genético en *Rubus glaucus*, mora de castilla; así como para el rescate de genes de interés para los cultivadores y para la producción de plantas certificadas que se adapten mejor al medioambiente permitiéndoles combatir eficientemente diversas plagas y enfermedades, lo que reduce el uso de pesticidas que afectan al planeta.

Otro aspecto importante de este método de propagación es que las plantas comerciales tienen las mismas características de la planta madre, es decir, son clones que mantienen su calidad genética prueba de ello es la

homogeneidad en las plantaciones tanto para la producción, el momento de la cosecha y las prácticas culturales.

Finalmente otro punto importante que favorece el empleo de esta nueva tecnología es que a partir de tejido foliar de plantas madres se podrían obtener miles de plantas comerciales en corto tiempo comparado con el método tradicional, las mismas que no requieren de un espacio excesivamente grande para ser almacenados, ni demandan mucha mano de obra para su cuidado y manutención.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo general del proyecto**

Establecer un protocolo para la obtención de proembriones a partir de callos desarrollados de tejido foliar de vitroplantas de mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*).

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Identificar el medio de cultivo más apropiado para la formación de callos embriogénicos.
- Verificar el desarrollo de los callos embriogénicos para la suspensión celular.
- Establecer la dosis óptima de giberelina: Ácido giberélico 3 (GA<sub>3</sub>) para la suspensión celular a partir de los callos embriogénicos desarrollados de hojas.
- Determinar la dinámica de crecimiento de la suspensión celular a desarrollarse en proembriones.

- Evaluar el porcentaje de proembriones obtenidos.

#### **1.4 Hipótesis**

Mediante combinaciones de fitohormonas a concentraciones adecuadas se establece un protocolo para la obtención de proembriones a partir de callos desarrollados de tejido foliar de vitroplantas de mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*)

## CAPÍTULO II

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 *Rubus glaucus Benth*, mora de castilla

##### 2.1.1 Origen y generalidades

La mora es una planta de origen silvestre, vive sola o en grupos, en las quebradas, montes, chaparros, al borde de caminos y carreteras.

La mora de castilla es originaria de zonas tropicales altas de América encontrándose principalmente en Colombia, Ecuador, Panamá, Guatemala, Honduras, México, El Salvador y Estados Unidos (Roa, 2006).

La mora *Rubus* sp. y especialmente la mora de castilla *Rubus glaucus* Benth fue descubierta por el investigador Popenoe, creciendo en estado silvestre en los andes ecuatorianos individualmente o formando grupos, con otras variedades. En el año 1921 este investigador encontró pequeñas plantaciones de mora de castilla en las provincias de Tungurahua, Imbabura y Pichincha (Ramírez et al, 2009).

La mora es una fruta muy apetecida tanto en el mercado nacional como internacional, por ser rica en minerales y vitaminas especialmente rica en vitamina C (Ramírez et al, 2009).

### 2.1.2 Taxonomía

La mora de castilla se clasifica de la siguiente forma:

**Reino:** Plantae.

**División:** Magnoliophyta.

**Clase:** Magnoliopsida.

**Subclase:** Rosidae.

**Orden:** Rosales

**Familia:** Rosáceae

**Subfamilia:** Rosoideae.

**Tribu:** Rubeae

**Género:** *Rubus*.

**Sugénero:** *Lampobatus*.

**Especie:** *Rubus glaucus*.

**Nombre científico:** *Rubus glaucus Benth.*

**Nombre vulgar:** *Mora de castilla. Zarzamora.*

(Cerón, 1993)

### 2.1.3 Características botánicas

La mora de castilla es un arbusto arqueado que alcanza hasta 3 metros de altura, en el cual el tallo se divide en varias ramas de color cenizo, alargadas, poco ramificadas y con un número considerable de espinas, las hojas son compuestas, de tres a cinco folíolos, tienen peciolo largo; el fruto es multidrupa o colectivo, constituido por pequeñas drupas insertadas sobre un pedúnculo blanco y blando, de forma cónica que al madurar adquiere un color rojo oscuro que se torna morado; las flores son de color blanco y blanco rosado (Reina, 1998).



**Figura 2.1:** Mora de castilla, *Rubus glaucus Benth.*

#### **2.1.4 Distribución geográfica**

Según Palaguachi (2011), existen en el país cuatro variedades que son: castilla, brazos, gato y criolla, las mismas que se adaptan a climas templados (de 14 a 19 grados centígrados) y a 1 800 metros sobre el nivel del mar.

En Tungurahua se encuentran 840 hectáreas de producción convirtiéndose así en la provincia del país que tiene la mayor área de cultivo, seguida de Cotopaxi con 430, Pichincha con 220 y Azuay con 50ha.

#### **2.1.5 Importancia económica**

Según Paucar (2011), la producción nacional de mora registra una expansión constante, debido a sus características organolépticas que permiten elaborar productos procesados de mejor calidad por lo cual será una excelente alternativa para diversificar las exportaciones. En Ecuador, las dos variedades más importantes de mora son la de Castilla y la de brazos, aunque la primera es la más cultivada.

## 2.1.6 Sistemas de propagación

La mora se propaga de manera sexual o asexualmente, siendo el método más recomendado comercialmente el asexual debido a que es más económico y da mejores resultados, en cambio la reproducción sexual no se emplea sino solo experimentalmente porque las semillas tienen un bajo poder germinativo, y a la vez su crecimiento es de forma muy lenta (Casaca et al, 2005).

### 2.1.6.1 Acodo

Según González (1997), el acodo es el método más seguro de obtener nuevas plantas, con suficiente raíz y brotes vigorosos. Hay dos maneras prácticas de hacer el acodo, utilizando toda una rama o sólo la punta.

El acodo es una técnica fácil para propagar plantas ya que algunos tallos de muchas plantas forman raíces de manera natural cuando se encuentran en contacto con el suelo y en otras plantas se debe lacerar el tallo para poder estimular el enraizado (Smith, 2008).



**Fuente:** FONAIAP, 1997.

**Figura 2.2:** Sistema de reproducción vegetativa de la mora de castilla.

### **2.1.6.2 Estaca**

La reproducción por estacas consiste en seleccionar partes vegetativas entre 20 y 30 cm de longitud, con tres o cuatro yemas cada una de ramas en crecimiento y evitar el uso de aquellas que estén en producción o provenir de áreas no muy tiernas y se siembran en bolsas de polietileno llenas de tierra (González, 1997).

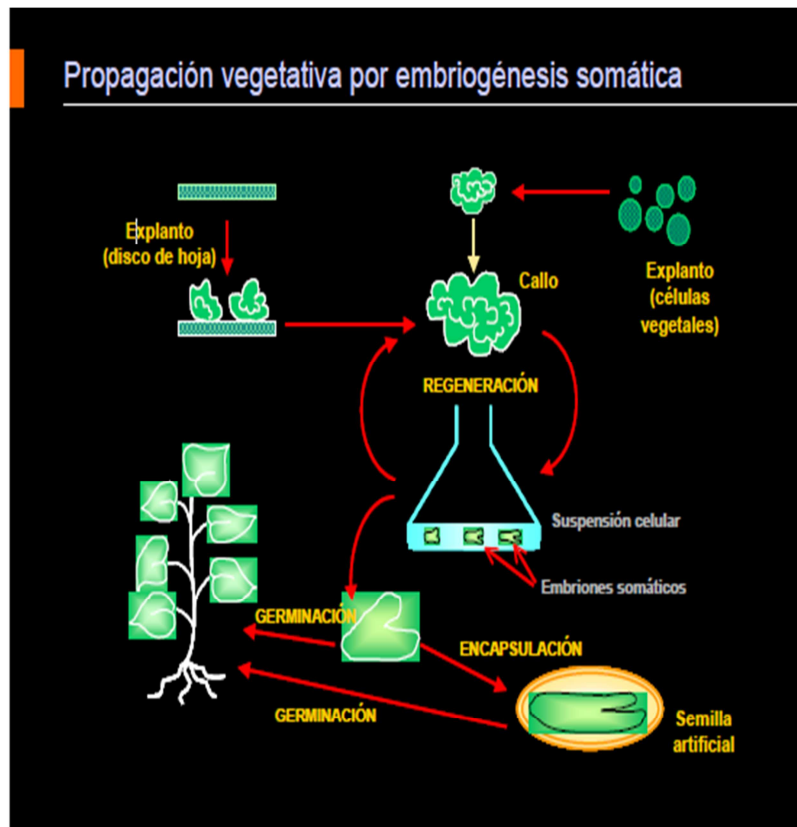
### **2.1.6.3 Cultivo *in vitro***

El cultivo *in vitro* de plantas superiores se define como un proceso mediante el cual semillas, embriones y órganos, explantes, tejidos de plantas bajo condiciones asépticas en presencia de una formulación de nutrientes y fitohormonas, permiten la producción de plantas. Este tipo de reproducción posee las siguientes ventajas: obtener plántulas de mora libres de virus, plántulas idénticas a la planta madre, obtención de muchas plántulas nuevas con poco material vegetativo entre otras (Castro et al, 2005).

## **2.2 Embriogénesis somática**

Según Freire (2003), la embriogénesis somática *in vitro* es posible ya que virtualmente cualquier tejido somático vegetal tiene la capacidad de desarrollarse en un embrión (totipotencia) a través de la manipulación de las condiciones de cultivo y la aplicación de reguladores del crecimiento.





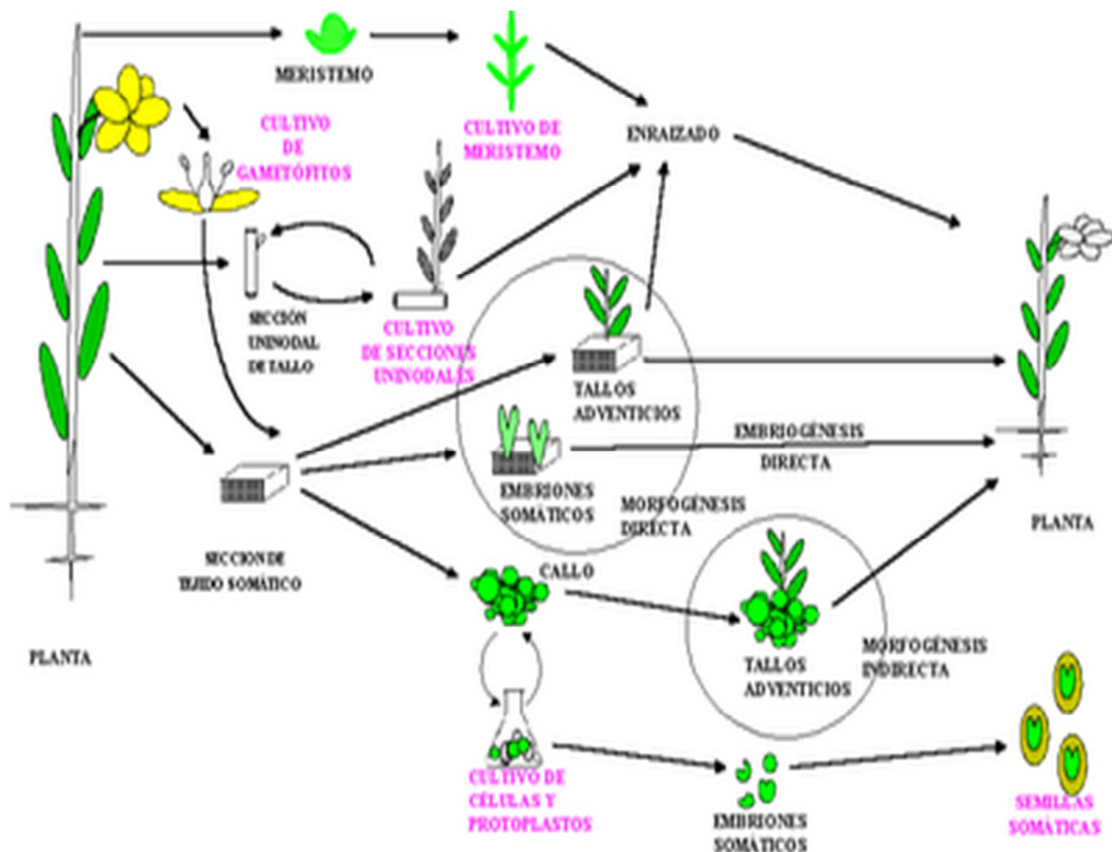
Fuente: Mercedes, 2011.

**Figura 2.3:** Propagación vegetativa por embriogénesis somática.

Existen dos tipos de embriogénesis somática:

### 2.2.1 Embriogénesis directa

Se obtienen embriones somáticos directamente desde células aisladas o grupos de células sin la formación de callo. Este desarrollo directo es debido a la acción realizada por la composición del medio de cultivo y el origen del explante.



Fuente: Martínez, 2012

Figura 2.4: Vías de multiplicación en cultivos *in vitro*.

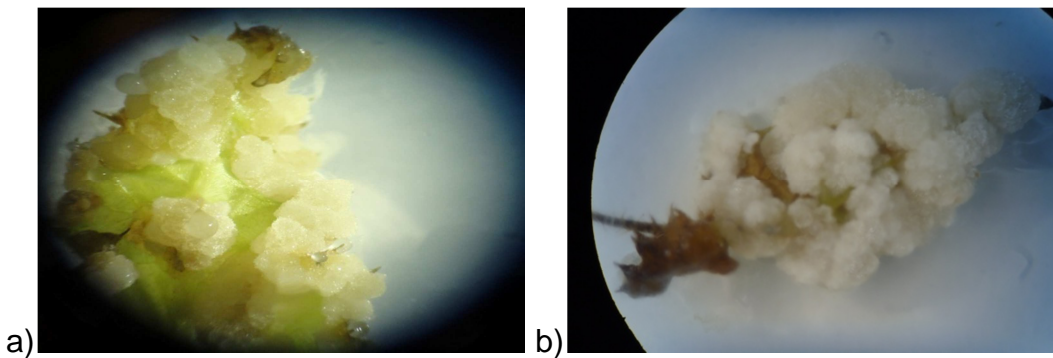
### 2.2.2 Embriogenesis indirecta

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

### 2.2.2.1 Callo

Es una masa amorfa surgida de la proliferación de células del parénquima. Frecuentemente es el resultado de una herida, la misma que puede ser localizada en un tallo, raíz y hoja.

Los callos no tienen patrones predecibles de organización, y una característica importante es su irregular crecimiento, teniendo el potencial para desarrollar raíces normales, brotes y embriones que forman plántulas (Lallana, 2003).



**Figura 2.5:** a) Aparición de callo, b) Callo de 4 semanas.

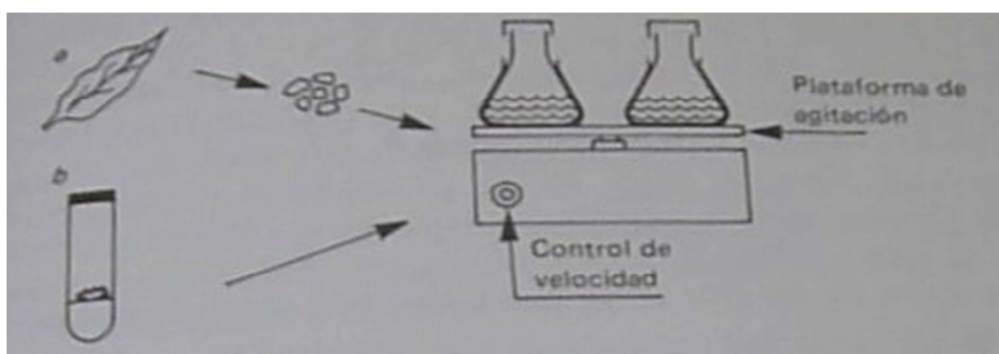
Los callos se clasifican en:

- a) Callos compacto.
- b) Callos embriogénicos o friables.
- c) Callos no embriogénicos.

## 2.3 Suspensión celular

El cultivo de células en suspensión consiste en un conjunto de células aisladas, así como de agregados celulares (de 2.0 a 100 células), distribuidos en un medio de cultivo líquido en constante movimiento. (Freire, 2003).

Las células vegetales son relativamente más grandes que las bacterias y hongos, pero aun dentro de un mismo cultivo existe una amplia variedad de formas y tamaños, desde esféricas hasta cilíndricas. Las dimensiones de estas células varían de 20 a 40µm de diámetro y de 30 a 200µm de longitud (Hurtado & Merino, 2001).



**Fuente:** Hurtado & Merino, 2001.

**Figura 2.6:** Establecimiento del cultivo de células en suspensión.

### 2.3.1 Tipos de sistemas

Según, Roca (1991) para mantener las suspensiones celulares existen tres tipos de sistemas de cultivo siendo los siguientes:

**Cerrados.-** Las células producidas se quedan en el medio, produciendo así el incremento en la densidad celular, al alcanzar la suspensión la fase estacionaria, se toma fracciones de la misma para volver a subcultivarla en medio fresco.

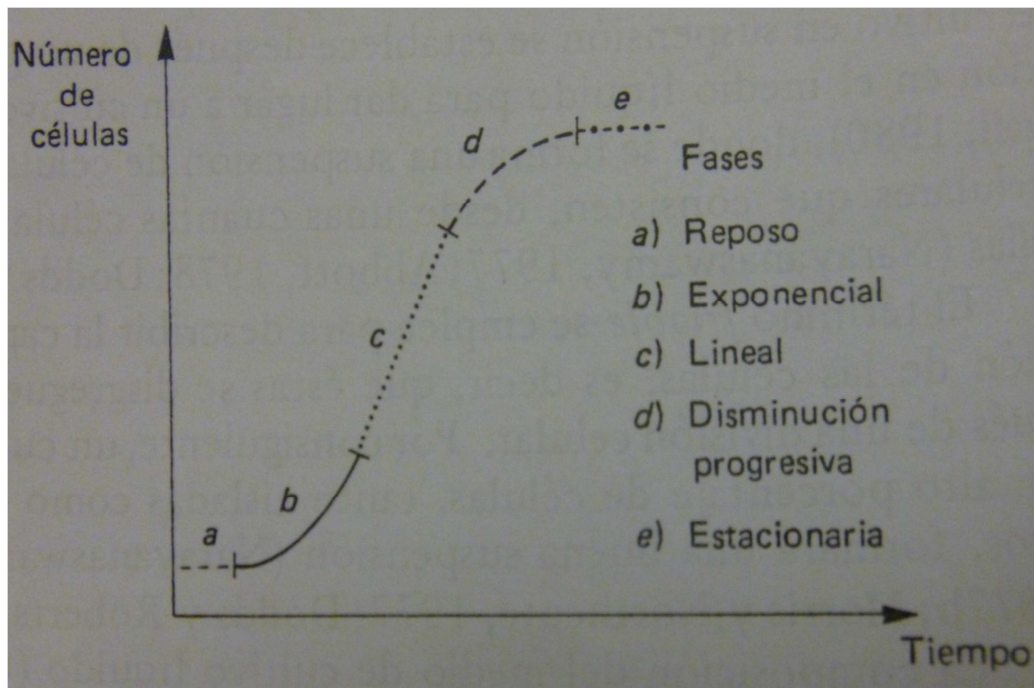
**Continuos cerrados.-** Se suministra a la solución medio fresco de forma continua siendo a la vez retirado sólo el medio usado; las células separadas mecánicamente se acumulan en el sistema.

**Continuos abiertos.-** se suministra a la solución medio fresco, pero el medio usado sale junto con las células.

### 2.3.2 Dinámica de crecimiento celular

En suspensiones celulares por lo general la dinámica de crecimiento celular es de tipo exponencial por lo que comprende tres fases que son:

- a) **Fase inicial o latencia.-** En esta fase la densidad de las células se mantiene hasta que las células se adaptan al medio de cultivo.
- b) **Fase de crecimiento.-** En esta fase el volumen celular aumenta.
- c) **Fase estacionaria.-** En esta fase el crecimiento se mantiene constante y el volumen celular no aumenta



**Fuente:** Hurtado & Merino, 2001.

**Figura 2.7:** Curva de crecimiento de las células en un cultivo en suspensión.

## 2.4 Bioreguladores.

### 2.4.1 Generalidades

Los bioreguladores son aquellos que en su formulación contienen moléculas protagónicas para la expresión o bien inhibición de un cierto proceso, estas moléculas generalmente son fitohormonas (idénticos a los compuestos naturales) o bien compuestos de efecto tipo hormonal (sintetizados en un laboratorio) (Wikipedia, 2012).

### 2.4.2 Clasificación

Se clasifican en:

**a) Auxinas.-** Las auxinas se emplean como promotores del crecimiento de la planta es decir en la proliferación celular, la inducción de la morfogénesis, entre otras, siendo sensibles a la luz. El representante es el ácido indol acético (AIA) proveniente del triptófano y esté esta universalmente presente en los tejidos vegetales (Hurtado & Merino, 2001).

Son naturales y otras sintéticas, además del ácido indolacético (AIA) se conocen: ácido naftalacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), 2, 4-D y 2, 4, 5 - T.

**b) Citoquininas.-** Las citoquininas son sustancias químicas que pueden estimular principalmente la división celular o citocinesis. Tanto las citoquininas naturales como sintéticas son derivados de la adenina (Hurtado & Merino, 2001).

La citoquinina representante es la zeatina extraída del endospermo de maíz. Encontramos también en forma sintética al 6-furfuril-aminopurina (cinetina), 6-bencilaminopurina (BAP) y thidiazuron (TDZ) (Rivero, 2011).

**c) Giberelinas.-** Las giberelinas estimulan el crecimiento de la planta. El ácido giberélico (GA) es la más conocida de esta clase de hormonas, la GA<sub>3</sub> fue la primera giberelina identificada y en la actualidad se conocen alrededor de 50 giberelinas (Hurtado & Merino, 2001).

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Participantes**

- **Instituciones:**
  - Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE.
  - Instituto Andino Superior Agropecuario- IASA.
  
- **Personas:**
  - Director: Dr. Darwin Rueda
  - Codirector: Ing.-Mat. Pedro Romero Saker.
  - Tesista: Srta. Andrea Alulema.

#### **3.2 Zona de estudio**

##### **3.2.1 Ubicación política**

La investigación se realizó en el laboratorio de Control Biológico y en el laboratorio de Genética y Biotecnología, ubicados en las instalaciones de la Hacienda El Prado, Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias de la ESPE, ubicada en la provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, ciudad de Sangolquí.





**Fuente:** Google Maps, 2012.

**Figura 3.1:** Fotografía satelital, IASA I, Ecuador, 2012.

### 3.2.2 Ubicación geográfica

El laboratorio esta geoposicionado en:

Latitud  $0^{\circ} 23' 28,29''$  S

Longitud  $78^{\circ} 24' 48,72''$

(Estación Meteorológica IASA, 2009).

### 3.2.3 Ubicación ecológica

Las instalaciones donde se realizó la investigación se ubican en el piso altitudinal bosque montano bajo del Norte de la Sierra, temperatura promedio

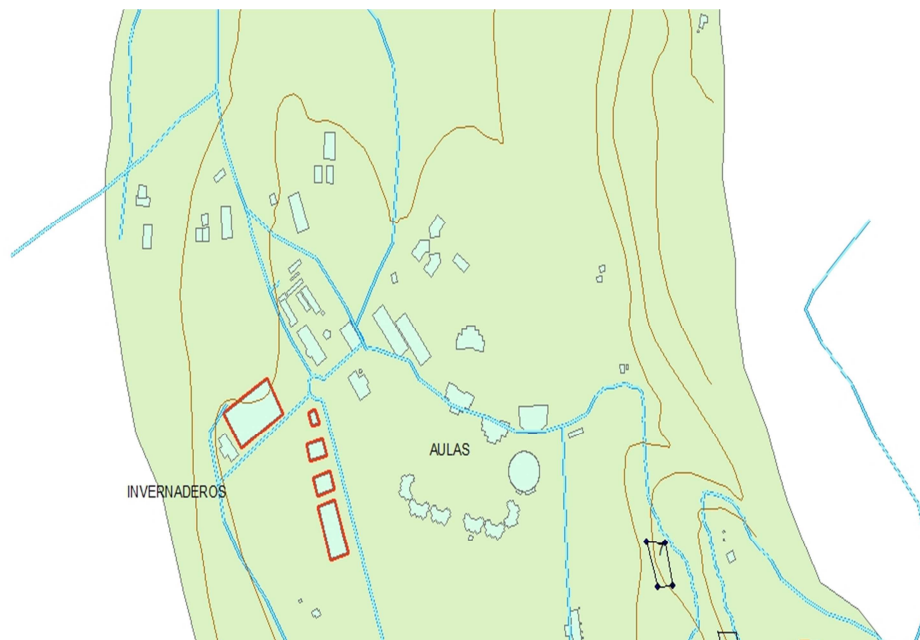
de 14 °C, pluviosidad anual 1285mm, altitud 2748 msnm y humedad relativa promedio de 69%.

### 3.2.4 Condiciones de laboratorio

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

### 3.3 Etapa de obtención del material vegetal

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

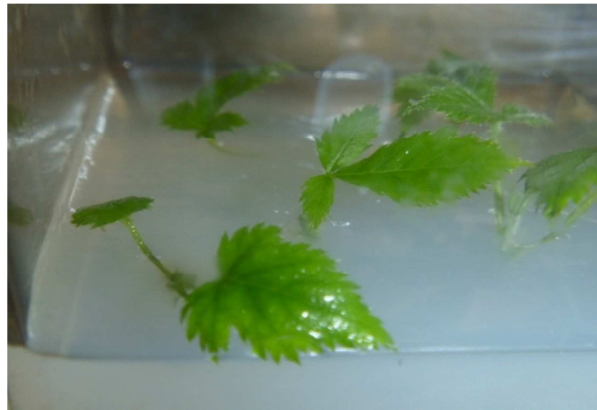


Fuente: Álvarez, 2013.

Figura 3.2: Mapa preliminar de la hacienda El Prado.

Cada dos o tres semanas, las plantas de mora cultivadas *in vitro*, fueron multiplicadas para así obtener el número de plantas necesarias que proveerán la cantidad de hojas requeridas para realizar los ensayos.

Para la multiplicación, se utilizaron fragmentos de tallos con un nudo, los mismos que se colocaron en un medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 100 mgxl-1 Myo Inositol, 150 mgxl-1 PVP, 50 mgxl-1 Ácido Ascórbico, 2 ppm BAP, 0.5 ppm AIA, 3% sucrosa y 0.7% agar. El pH del medio fue ajustado a 5.8 antes de ser autoclavado. El procedimiento señalado se realizó en cajas magenta.

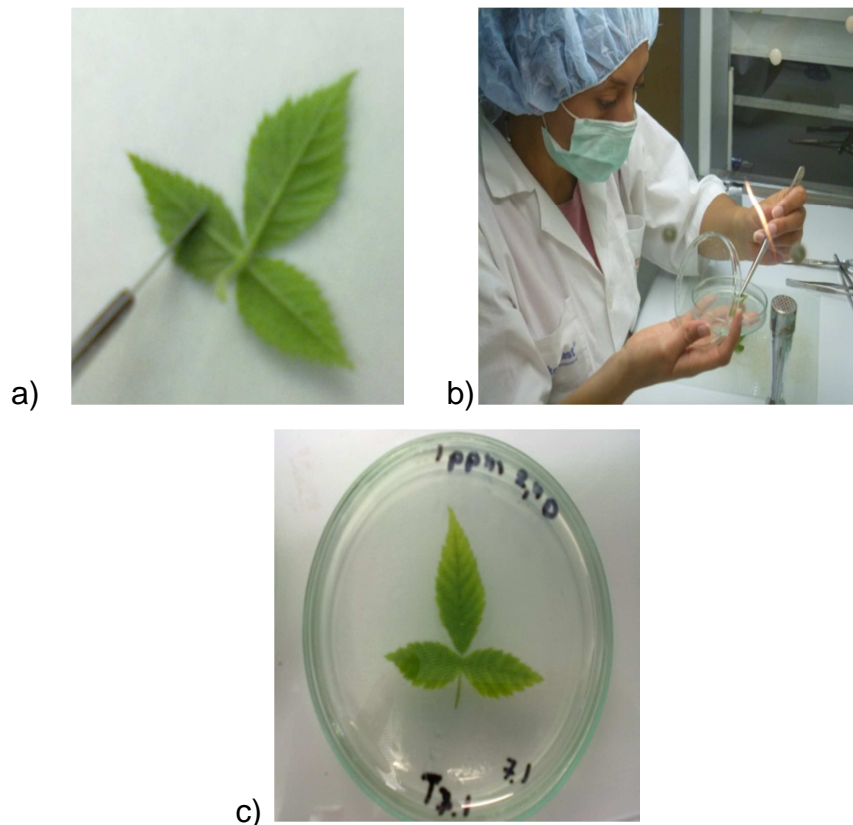


**Figura 3.3:** Fase de multiplicación de mora de castilla.

### **3.4 Etapa de inducción a callo embriogénico**

#### **3.4.1 Primera fase:**

Al finalizar las cuatro semanas, de acuerdo a lo descrito por Dohm *et al.*, (2000), se seccionaron las hojas en la base, a las mismas se les practicó varios cortes en su nervadura central y se las introdujeron adaxialmente en cajas Petri en medio de inducción.

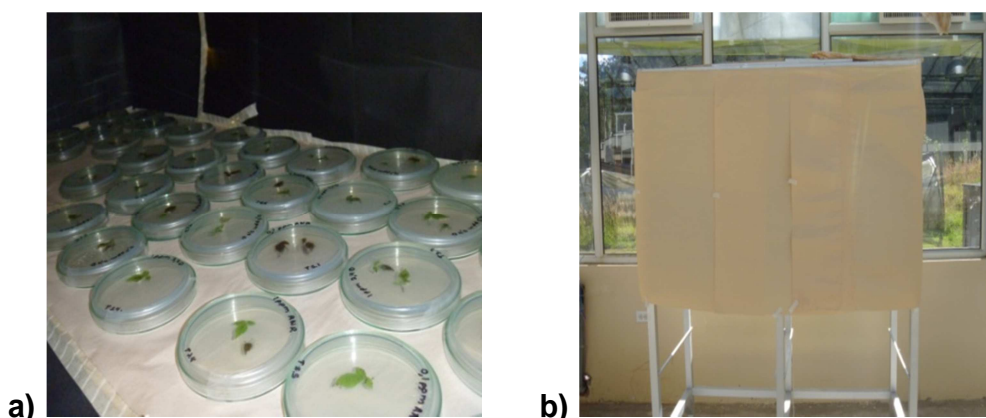


**Figura 3.4:** a) Cortes en las nervaduras de la hoja. b) Siembra de las hojas de mora. c) Cajas Petri con medio de inducción.

En esta etapa se realizó ensayos para determinar la concentración de fitohormonas para la formación de callos embriogénicos, se formuló medio básico de Murashige y Skoog (MS) al 100%, al cual se le adicionó diferentes concentraciones de auxinas (2,4D y ANA) (Ver tabla 3.1 y 3.2).

Los ensayos fueron sometidos por cuatro semanas a oscuridad, a temperatura controlada de 25°C en el invernadero cuarentenario para impedir la fenolización de los explantes. La fenolización es la liberación de compuestos fenólicos, la oxidación fenólica aparece como consecuencia de los cortes durante la preparación de los explantes. Los compuestos oxidados son altamente fitotóxicos, lo cual puede llegar a producir la muerte de los explantes. (Marulanda, 2001).

Así también las condiciones de oscuridad evitan que las auxinas se degraden mediante la luz (Hurtado & Merino, 2001).



**Figura 3.5:** a)Medios de inducción en cámara oscura, b) Cámara oscura.

### 3.4.1.1 Diseño estadístico

Se realizó un Diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial de AxB donde A presenta 2 niveles y el factor B tiene 4 niveles. El estudio no corresponde a un DBCA porque no es a través del tiempo donde el tiempo en este caso viene a ser una co-variable.

La unidad experimental fue un grupo de cinco cajas Petri sobre las cuales se aplicaron siete tratamientos, según los niveles de concentración y el tipo de auxinas aplicadas, como se describe a continuación:

**Tabla 3.1:** Concentraciones de 2,4D en medio MS, para la formación de callo embriogénico de *Rubus glaucus* Benth.

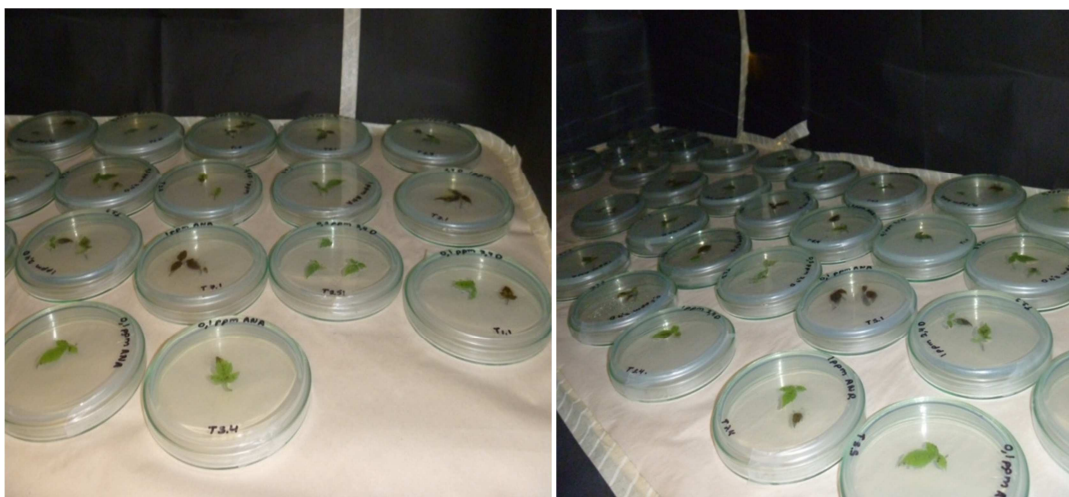
Hojas con cortes en su nervadura central	Concentración MS + 2,4 D			
	0 ppm	0.1 ppm	0.5 ppm	1 ppm
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>

**Tabla 3.2:** Concentraciones de ANA en medio MS para la formación de Callo embriogénico de *Rubus glaucus Benth.*

Hojas con cortes en su nervadura central	Concentración MS + ANA			
	0 ppm	0.1 ppm	0.5 ppm	1 ppm
	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>7</sub>

Los tratamientos que contienen 0 ppm de hormona 2,4 D y ANA, corresponden a los tratamientos testigo T<sub>0</sub> y T<sub>4</sub> respectivamente.

Los datos se analizaron mediante un Anova con una prueba de Duncan al 5% para verificar la mejor auxina y a mejor concentración para favorecer la inducción a la formación de callos embriogénicos.



**Figura 3.6:** Tratamientos en medio de inducción.

### **3.4.1.2 Variables evaluadas**

La variable de respuesta fue la siguiente:

**Número de callos:** Se define como el número de callos obtenidos en cada tratamiento a partir de una hoja seccionada en la base e introducida en el medio de inducción. Se contaron visualmente cada semana hasta la cuarta semana en cada ensayo.

### **3.4.1.3 Características de la unidad experimental**

Para la primera fase de inducción de callo, cada unidad experimental estuvo constituida por una caja Petri, donde se dispensaron 10mL de medio de cultivo apropiado y se colocó un explante.

### **3.4.2 Segunda fase:**

Después de cuatro semanas los callos se cambiaron a otro medio en donde se realizaron ensayos para determinar la concentración de fitohormonas para el incremento del tamaño de los callos embriogénicos obtenidos en la fase anterior.

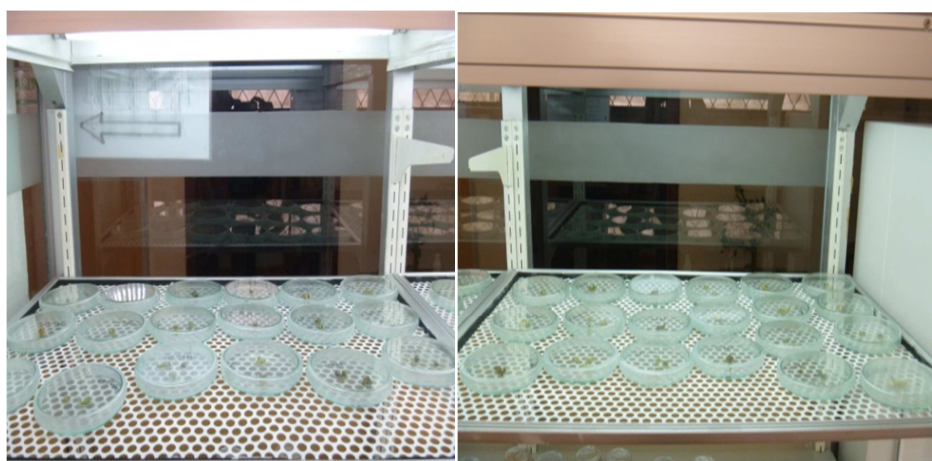
Se utilizó medio básico de Murashige y Skoog (MS) al 100%, al cual se le adicionó diferentes concentraciones de Thidiazuron (TDZ) y Zeatina (ver tabla 3.3 y 3.4).





**Figura 3.7:** Introducción de callo a medio con citoquininas.

Los ensayos fueron sometidos por tres semanas a luz y a temperatura controlada de 25°C en el laboratorio de Genética y Biotecnología en el IASA I.



**Figura 3.8:** Tratamientos en medio con citoquininas.

#### **3.4.2.1 Diseño estadístico**

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial de  $A \times B$  donde A presenta 2 niveles y el factor B tiene 4 niveles.

Las hojas de la primera fase pasan a otro medio donde se probaron las concentraciones de fitohormonas como se describe a continuación:



**Tabla 3.3:** Concentraciones TDZ en medio MS, para la formación de callo embriogénico de *Rubus glaucus Benth.*

Callo de 4 semanas	Concentración MS + TDZ			
	0 ppm	0.1 ppm	0.5 ppm	1 ppm
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>

**Tabla 3.4:** Concentraciones Zeatina en medio MS para la formación de Callo embriogénico de *Rubus glaucus Benth.*

Callo de 4 semanas	Concentración MS + Zeatina			
	0 ppm	0.1 ppm	0.5 ppm	1 ppm
	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>7</sub>

Los tratamientos que contienen 0 ppm de hormona TDZ y Zeatina, corresponden a los tratamientos testigo T0 y T4 respectivamente.

El análisis mediante un ANOVA permite identificar la mejor concentración y la fitohormona que favorece el crecimiento de los callos embriogénicos.

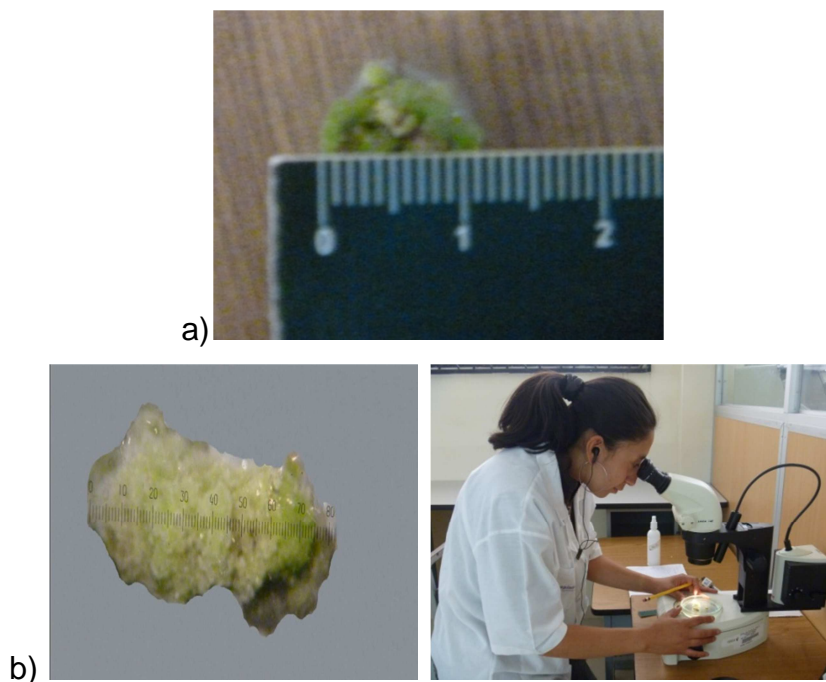
### 3.4.2.2 Variables evaluadas

Las variables de respuesta fueron las siguientes:

**Tamaño de callos:** Se define como el tamaño de callos obtenidos en cada tratamiento a partir de las hojas de la fase de introducción e introducida en el medio de crecimiento que contiene citoquininas. Se tomó las medidas

desde la quinta semana hasta la octava semana en cada ensayo desde el momento de la introducción en el medio de crecimiento.




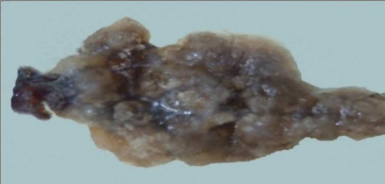

Esta variable fue tomada de manera manual con regla, para su mayor exactitud se usó el programa ImageJ y también con el micrómetro colocada en el estere microscopio Leico.



**Figura 3.9:** Toma de medidas del callo a) Con regla, b) Con micrómetro en el estéreo microscopio.

**Color de callo:** Se define como el color del callo obtenidos en cada tratamiento a partir de las hojas de la fase anterior de introducción e introducida en el medio de crecimiento que contiene citoquininas. Se visualizó en la octava semana en cada ensayo desde el momento de la introducción. Los parámetros que se tomaron en cuenta se muestran a continuación:

**Tabla 3.5:** Coloración de callos. IASA. 2013.

Callo	Coloración	Fotografía
Friable	Verde	
Compacto Tipo 1	Cristalino	
Compacto Tipo 2	Blanquesino	
Muerto	Negruzco	
No embriogénico	Café	

### 3.4.2.3 Características de la unidades experimentales

Para la segunda fase de inducción de callo, en el medio de crecimiento que contiene citoquininas cada unidad experimental estuvo constituida por una caja Petri, donde se dispensaron 10 mL de medio de cultivo y se introdujo un explante.

### 3.5 Etapa de cultivo de células en suspensión

En esta etapa se realizo ensayos para determinar la cocentración de fitohormonas para la suspensión celular. Se inicio con la incubación de trozos de callos friables obtenidos de la fase anterior en medios líquidos de MS + ANA+ Zeatine + diferentes conectraciones de GA<sub>3</sub> (ver tabla 3.6).

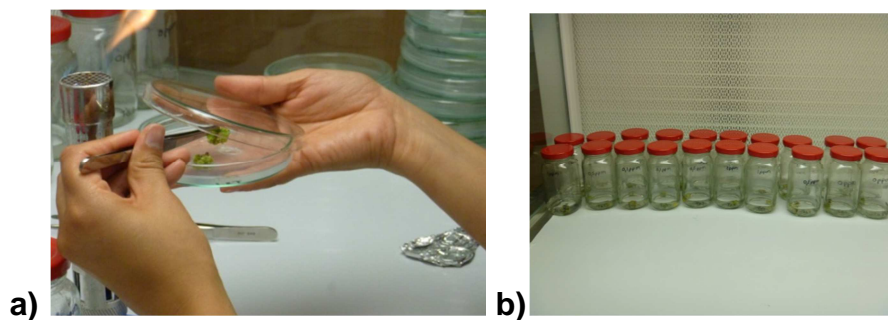
**Tabla 3.6:** Concentraciones de GA<sub>3</sub> en medio MS para la suspensión celular de *Rubus glaucus Benth.*

Callos friables	Concentración MS+ GA <sub>3</sub>			
	0 ppm	0.1 ppm	0.5 ppm	1 ppm

Según Aguilar *et. Al.* (2008) se inicia la suspensión celular en cajas multihuecos de seis cavidades, cada una de ellas es cubierta por 5ml del medio de cultivo, conforme va incrementando el volumen de la suspensión.

Según Roca (1991) se llenaran aproximadamente 1/5 de la capacidad de los Erlenmeyer, los mismos que se colocan en un agitador giratorio a 80-150 rpm, bajo luz continua y a 25°C de temperatura.

A los callos friables obtenidos de la fase anterior se les practicó finos cortes para ayudar al desprendimiento celular y obtener células en menos tiempo. Se los introdujo en frascos para cultivo celular que contiene en el medio líquido, los mismos que se colocaron en el agitador incubador marca Incubator Shaker Series, serie Innova R40 a una temperatura de 25°C y a 90rpm.



**Figura 3.10:** a) Introducción de callos friables a medio de cultivo con GA<sub>3</sub>.  
b) Callos en medio de cultivo de multiplicación.



**Figura 3.11:** Agitador incubador.

La suspensión es filtrada mediante el uso de un tamiz, con el fin de eliminar aquellos componentes celulares que no cumplen con las características óptimas para establecer una suspensión celular (Aguilar, 2008).

Para determinar la dinámica de crecimiento de la suspensión celular se establece la curva de crecimiento la misma que se hizo un recuento celular mediante un microscopio marca Olympus CH30, mediante la cámara de Neubauer y con ayuda del programa ImagenJ para cada intervalo de evaluación que fue diario durante nueve días.



**Figura 3.12:** Recuento celular. a) Toma de muestra y cámara de Neubauer, b) Visualización en el microscopio.

### 3.4.1 Diseño estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) tomando en cuenta el tiempo de crecimiento. Se probaron las concentraciones de GA<sub>3</sub> como se describe a continuación:

**Tabla 3.7:** Concentraciones de GA<sub>3</sub> en medio MS para la suspensión celular de *Rubus glaucus Benth.*

Callos friables	Concentración MS+ GA <sub>3</sub>			
	0 ppm	0.1 ppm	0.5 ppm	1 ppm
	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>

Teniendo como tratamiento testigo S<sub>0</sub> a la concentración 0ppm de GA<sub>3</sub>. En esta etapa se recolecto datos desde el día cuarto hasta el día noveno después de transcurrida la introducción de los callos en los tratamientos con la fitohormona GA<sub>3</sub>.

Y finalmente en los 9 días se efectuó una prueba de Kruskal Wallis (ver anexo 3) para ver diferencia entre los tratamientos y para comprobar la emergencia de proembriones.

Después se realizó una siembra de los protoplastos obtenidos en medio sólido que contenía MS+0,5ppm 2,4D para confirmar su viabilidad.

### 3.4.2 Variables evaluadas

**Crecimiento celular:** Se define el crecimiento celular obtenido en cada tratamiento a partir de callos de la fase de crecimiento en citoquininas. Se tomó

las medidas diariamente durante 9 días en cada ensayo desde el momento de la introducción con GA<sub>3</sub>.

### **3.4.3 Características de la unidades experimentales**

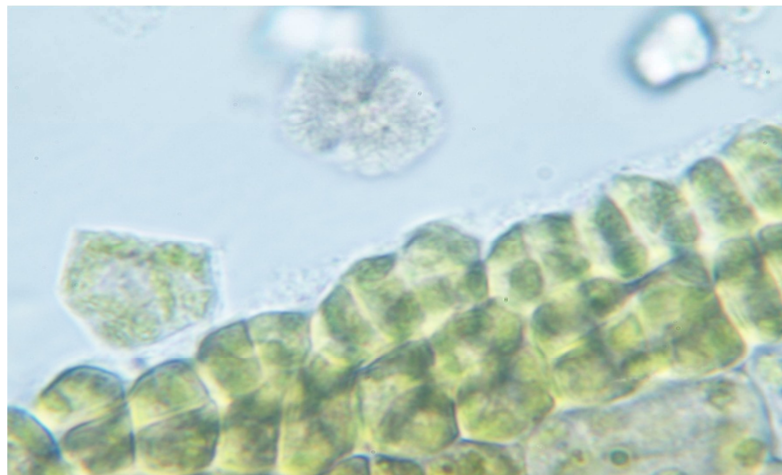
Para la fase de suspensión celular, en el medio de introducción que contiene MS+GA<sub>3</sub> cada unidad experimental fue constituida por un frasco de cultivo celular, donde se dispensó 20 mL de medio de cultivo y se colocó un explante (callo friable).



## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

En la presente investigación, realizada en mora de Castilla (*Rubus glaucus Benth*), fue posible obtener un cultivo celular a partir de explantes de hojas in vitro (Figura 4.1), tal como se ha evidenciado en estudios similares realizados en plátano y banano por Aguilar et al (2008).



**Figura 4.1:** Cultivo celular.

#### **4.1. Inducción a callo (callogénesis)**

##### **4.1.1 Primera fase.**

En esta fase se obtuvieron como resultado a la segunda semana un promedio de siete callos en el tratamiento T<sub>2</sub> (MS+0,5ppm de 2,4-D) a diferencia de los demás tratamientos que se obtuvo un promedio de tres callos y al finalizar la

cuarta semana en el mismo tratamiento los callos ocuparon el 100% de la hoja, como se muestra en la figura 4.2.

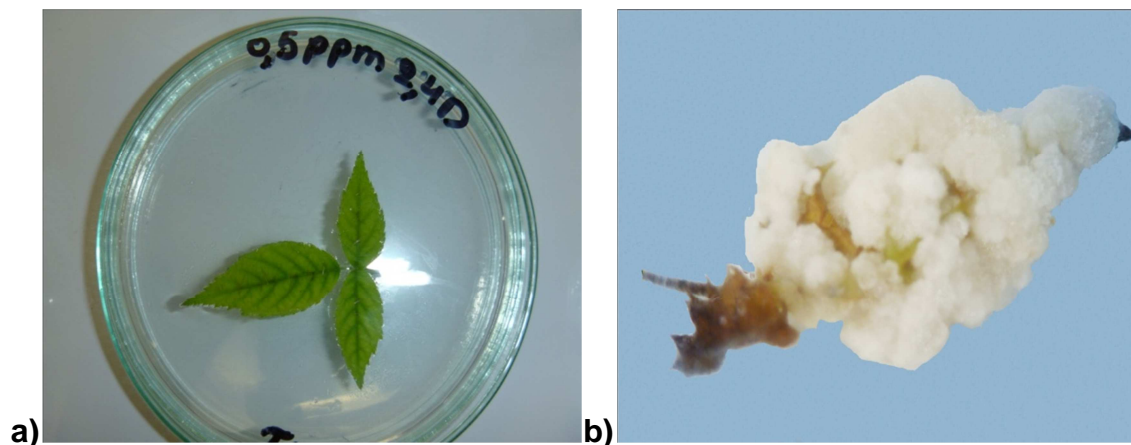


Figura 4.2: Inducción a callo a) A la primera semana, b) A la cuarta semana.

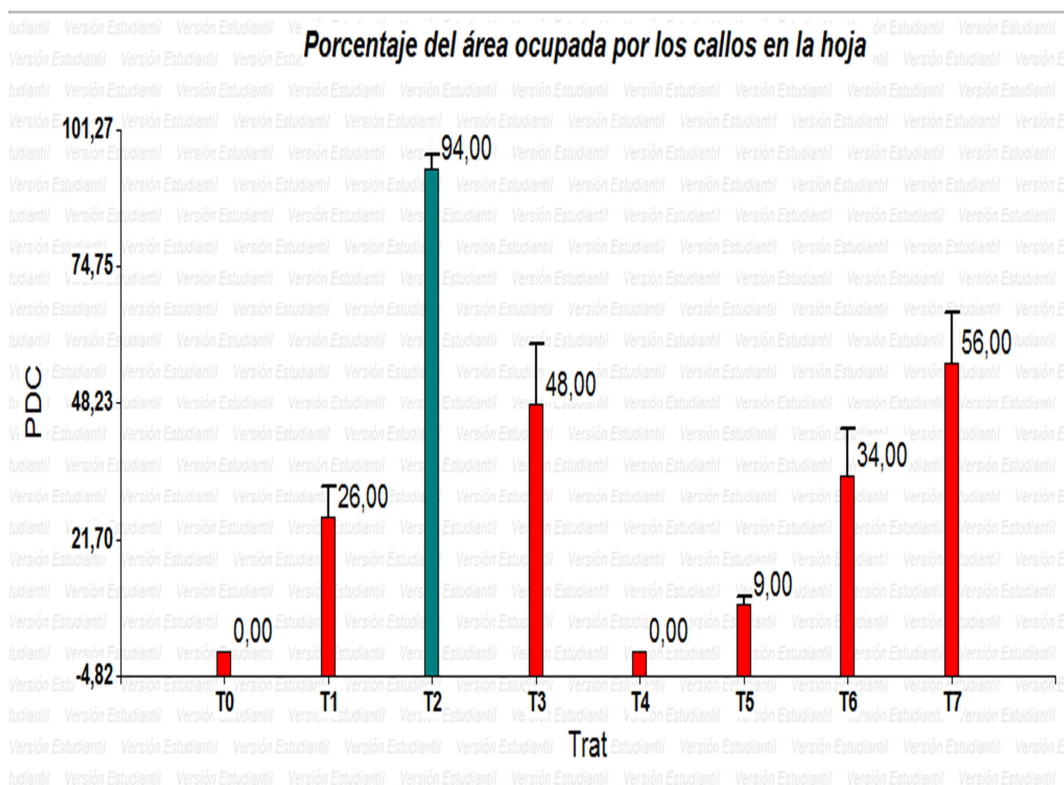


Gráfico 4.1: Tratamientos evaluados para el desarrollo de los callos en la fase de inducción

Al establecer el análisis de varianza para el número de callos obtenidos en el medio de inducción con auxinas se encontró una diferencia estadística en el tratamiento 2 a un nivel del 5% mediante el programa estadístico Infostat (Cuadro 4.1).

**Cuadro 4.1:** Análisis de varianza para el número de callos en medio de inducción con auxinas, IASA I, Ecuador, 2013.

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PDC	40	0,84	0,80	44,88

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	36389,38	7	5198,48	23,17	<0,0001
Trat	36389,38	7	5198,48	23,17	<0,0001
Error	7180,00	32	224,38		
Total	43569,38	39			

La prueba de Duncan (cuadro 4.2) determinó que en la inducción a callo con auxinas el mejor tratamiento fue el tratamiento T<sub>2</sub>, que consiste en 0,5ppm de 2,4 D, seguido por el tratamiento T<sub>7</sub> y T<sub>3</sub> a concentraciones de 1ppm de ANA y 1ppm de 2,4D respectivamente. El T<sub>2</sub> presentó mayor número de callos (48) formados hasta la cuarta semana a diferencia de los tratamientos T<sub>7</sub> y T<sub>3</sub> con (24) y (20) callos cada uno.

**Cuadro 4.2:** Prueba de Duncan, IASA I, Ecuador, 2013.

**Test:Duncan Alfa=0,05**

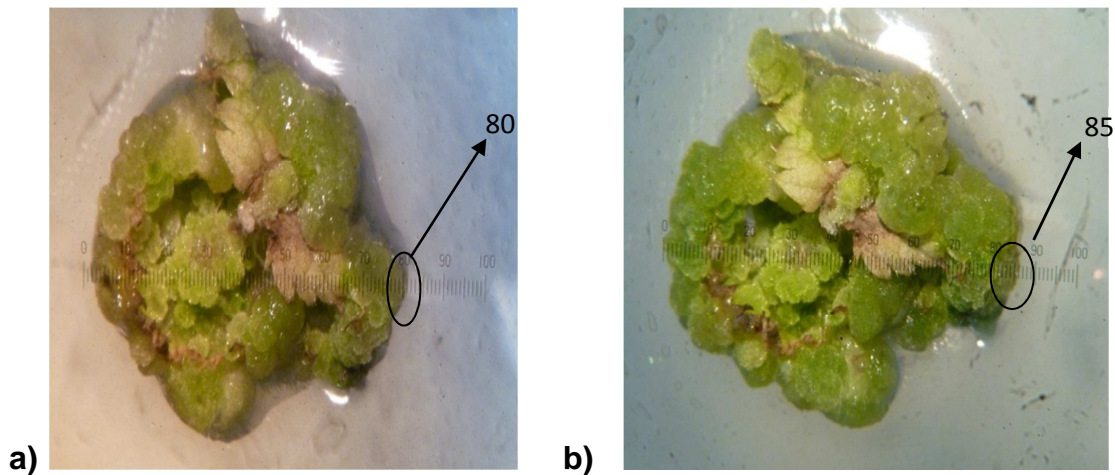
Error: 224,3750 gl: 32

Trat	Medias	n	E.E.	
T4	0,00	5	6,70	A
T0	0,00	5	6,70	A
T5	9,00	5	6,70	A B
T1	26,00	5	6,70	B C
T6	34,00	5	6,70	C D
T3	48,00	5	6,70	D E
T7	56,00	5	6,70	E
T2	94,00	5	6,70	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

#### 4.1.2 Segunda fase

El crecimiento de los callos inició en la segunda semana en el tratamiento T<sub>6</sub> que contiene MS+0,5ppm de Zeatine y al finalizar la tercera semana se registró un aumento promedio de 0,5 cm del tamaño del callo como se muestra en la figura 4.3.



**Figura 4.3:** Crecimiento de callo en el T<sub>6</sub> a) A la segunda semana, b) A la tercera semana.

Al establecer el análisis de varianza para el tamaño de callos obtenidos en el medio de crecimiento con citoquininas se encontró diferencias estadísticas entre los tratamientos. Se obtuvo una F de 33,25 y  $p < 0,0001$  a un nivel del 5% error (Cuadro 4.3).

**Cuadro 4.3:** Análisis de varianza para el tamaño de callos en medio de crecimiento con citoquininas, IASA I, Ecuador, 2013.

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
TF	400,88	0,85	40,80	

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,93	7	0,13	33,25	<0,0001
Trat	0,93	7	0,13	33,25	<0,0001
Error	0,13	32	4,0E-03		
Total	1,06	39			

En el incremento de tamaño del callo con citoquininas el mejor tratamiento fue el T<sub>6</sub>, que consiste en 0,5ppm de Zeatine, y este incremento consistió en un promedio de 0,4 a 0,5cm por semana, seguido por el tratamiento T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> a concentraciones de 0,5ppm y 1ppm de TDZ respectivamente, con un incremento de 0,1 a 0,3cm por semana y este fue evaluado mediante la prueba de Duncan (ver cuadro 4.4 y Anexo 2.1).

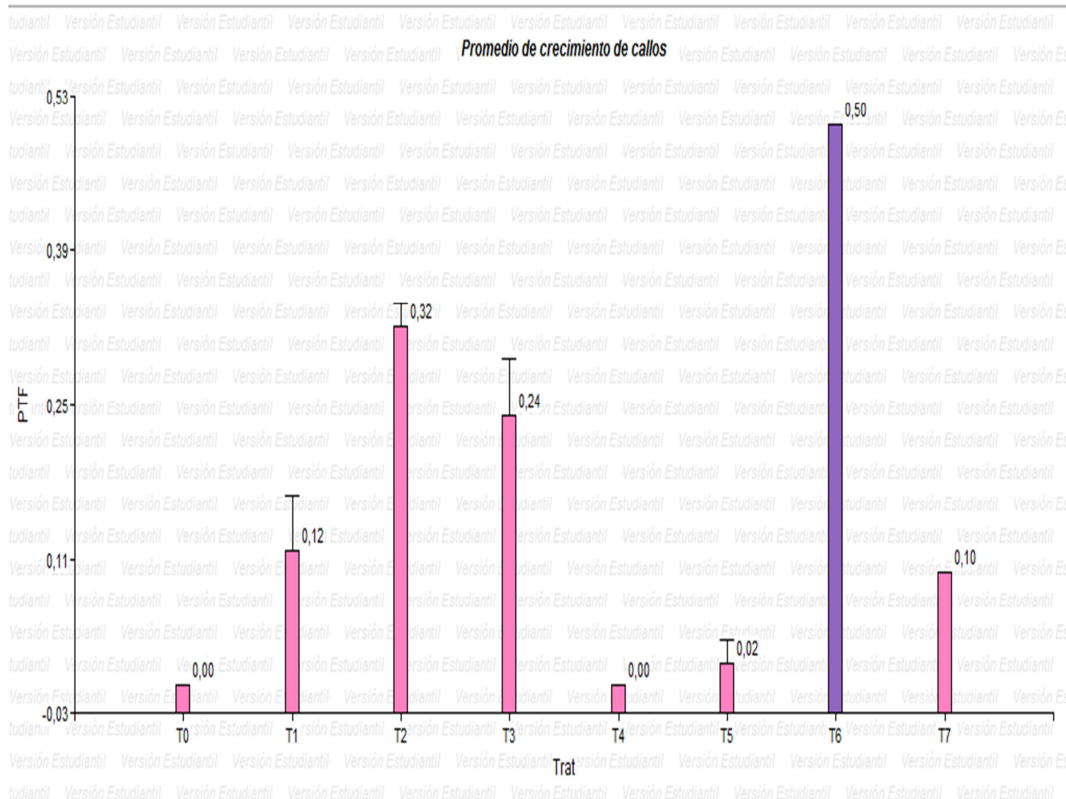
**Cuadro 4.4:** Prueba de Duncan, IASA I, Ecuador, 2013.

**Test:Duncan Alfa=0,05**

Error: 0,0040 gl: 32

Trat	Medias	n	E.E.	
T4	0,00	5	0,03	A
T0	0,00	5	0,03	A
T5	0,02	5	0,03	A B
T7	0,10	5	0,03	B C
T1	0,12	5	0,03	C
T3	0,24	5	0,03	D
T2	0,32	5	0,03	D
T6	0,44	5	0,03	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes(p<= 0,05)

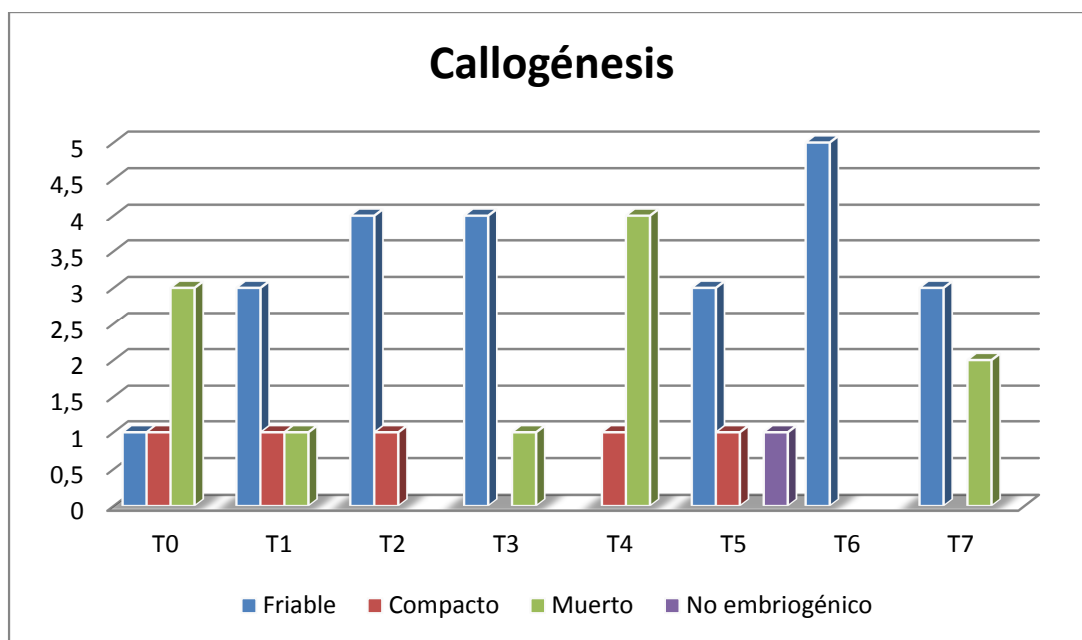


**Gráfico 4.2:** Tratamientos evaluados para el incremento de tamaño de los callos producidos en la fase 1.

El resultado mostrado en colorimetría confirma que los callos friables aparecieron en el tratamiento T<sub>6</sub> (MS+0,5ppm de Zeatine), por lo que fueron usados para continuar con la siguiente fase como se observa en la figura 4.4, anexo 1.3 y grafico 4.3.



**Figura 4.4:** Callos del T<sub>6</sub> (MS+0,5ppm de Zeatine).



**Gráfico 4.3:** Tipos de callos obtenidos en la fase de calogénesis.

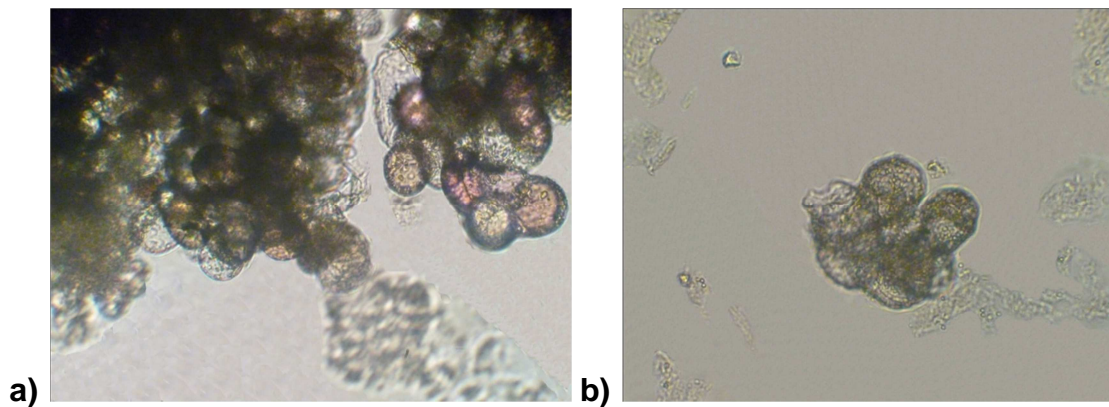
El gráfico 4.2 detalla el tipo de callos obtenidos en cada tratamiento luego de haber sido expuestos al medio enriquecido con citoquininas para su crecimiento. Todos los tratamientos presentaron la formación de callos friables con un 57,5%, seguido de los callos muertos con un 27,5%, los compactos un 12,5% y finalmente los callos no embriogénicos que alcanzaron un 2,5%.

Pero siendo el mejor tratamiento el T<sub>6</sub> con un 100%, seguido del tratamiento T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> con un 80% de callos friables.

#### 4.2. Suspensión celular.

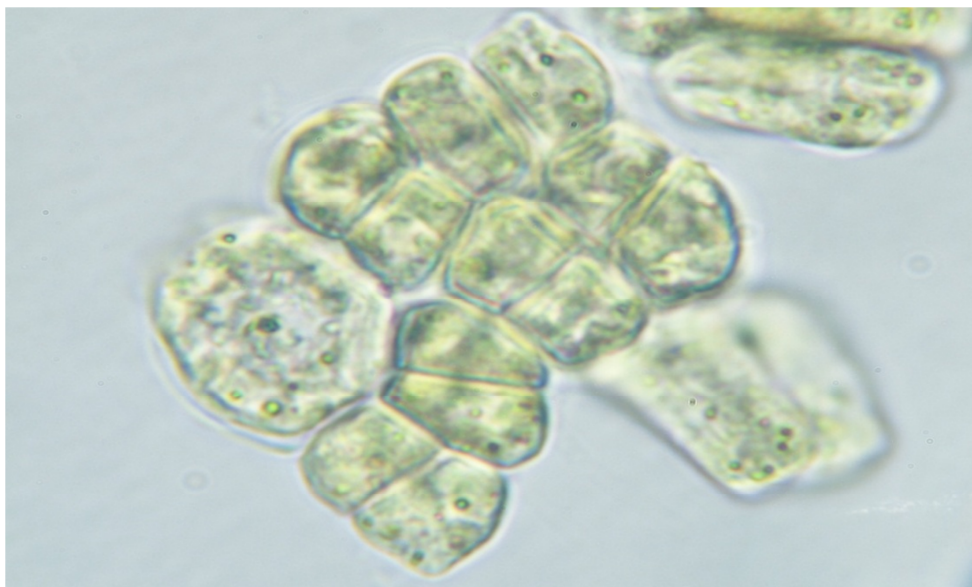
En la fase de suspensión celular se observó primero un desprendimiento celular de los callos introducidos en el tratamiento T<sub>2</sub> (ver figura 4.4) en el cual las células liberadas pasaron por un período de adaptación donde algunas células murieron. Las células sobrevivientes comenzaron un proceso de proliferación, una multiplicación celular, en el medio correspondiente.





**Figura 4.5:** Desprendimiento celular. a) Células adheridas a los callos y inicio de desprendimiento. b) Células desprendidas.

A las células obtenidas se les colocó en un medio nutritivo MS+GA<sub>3</sub> en donde con la prueba de Kruskal Wallis (ver anexo 3.3) nos indica que el tratamiento más óptimo para su multiplicación fue el T<sub>2</sub>, teniendo un promedio total de 141 667 células/ml en el cuarto día ya que después de ese día se mantuvo estable y comenzó haber multiplicaciones continuas lo que dio origen a aglutinaciones celulares como se muestra en la figura 4.5.



**Figura 4.6:** Aglutinaciones celulares al quinto día.

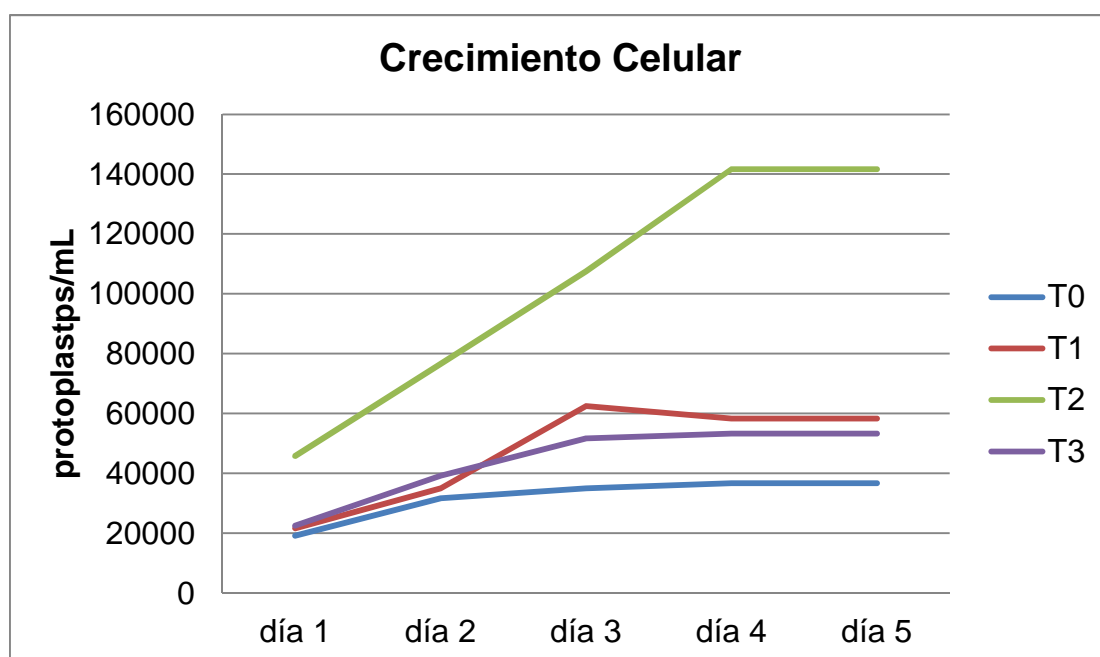


**Cuadro 4.5:** Prueba de Kruskal Wallis, IASA I, 2013.

Variable	Trat/Observ	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
día 4	0	3	27,33	2,31	26,00	7,82	0,0493
día 4	1	3	23,33	7,57	20,00		
día 4	2	3	56,67	12,74	63,00		
día 4	3	3	21,33	4,04	22,00		

Trat.	Ranks
3	3,33 A
1	4,67 A
0	7,00 A B
2	11,00 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

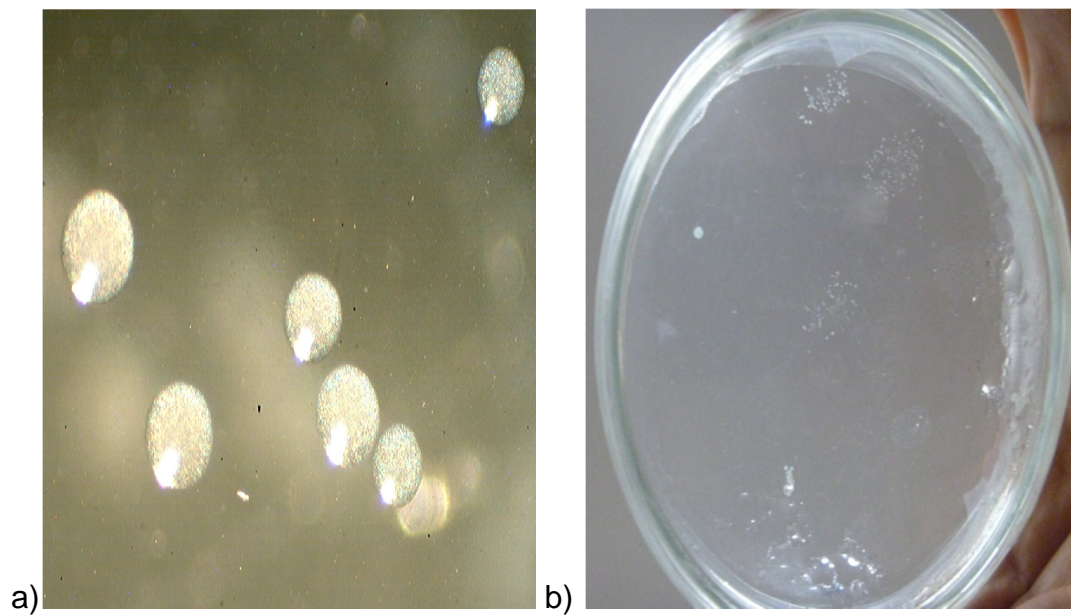


**Gráfico 4.4:** Crecimiento celular en Medio MS+GA<sub>3</sub>.

Como se muestra en el gráfico 4.3 el mejor tratamiento es el T<sub>2</sub> debido a que desde el día uno hasta el día quinto se mantuvo en crecimiento constante, a diferencia en el tratamiento T<sub>1</sub> en el día tres disminuyó la concentración

celular y en el tratamiento  $T_0$  se observa que la multiplicación celular es mínima.

Los protoplastos sembrados en medio sólido (MS+2,4D) se obtuvo formación de microcallos como se observa en la figura 4.7.



**Figura 4.7:** Microcallos. a) Observación microscópica, b) Observación macroscópica.

## **CAPÍTULO V**

### **DISCUSIÓN**

#### **5.1. Callogénesis**

Para lograr el desarrollo del 100% de callos con auxinas fue necesario realizar el tratamiento en oscuridad total ya que las auxinas son altamente sensibles a la luz y pierden su actividad hormonal (Dohm *et al*,2000). El desarrollo de callos e incremento de 5cm se logró con el uso de las citoquininas en presencia de luz.

El mejor desarrollo de callos se logro con concentraciones de 0,5ppm de 2,4D y el 0,5ppm de Zeatine.

##### **5.1.1. Fase uno**

Cortes paralelos a la nervadura de la hoja de mora de castilla fueron muy importantes para lograr mejor contacto de las hormonas y mayor desarrollo de callos en períodos más cortos de tiempo, lo cual se corrobora con la metodología descrita por Dohm *et al*. 2000.

Para lograr una mejor proliferación celular se probaron diferentes concentraciones de fitohormonas BAP+2,4D y BAP+ANA, de esta interacción la

mejor proliferación celular se consiguió BAP+ 2,4D, lo mencionado con coincide con los trabajos hechos por Hurtado & Merino (2001).

Shanthi *et al.* (1996), y Dohm *et al.* (2000) lograron obtener callos a las 8 semanas y 6 semanas utilizando concentraciones de 0,022ppm y 1ppm respectivamente, en la presente investigación se obtuvieron callos de mora de castilla a las 2 semanas utilizando una concentración de 0,5ppm, lo que demostró que una concentración intermedia resulta más adecuada permitiendo ahorrar tiempo y reactivos. De lo señalado se desprende que usando concentraciones altas o bajas la absorción hormonal de las hojas es lenta.

El medio MS + ANA utilizado en la investigación indica que la mejor concentración de ANA es de 1ppm permitiendo obtener callos a las 2 semanas. Estos resultados positivos se lograron sometiendo los tratamientos a oscuridad lo que se contrapone a los resultados obtenidos por Rivera & Perea (2004), los cuales utilizaron fotoperiodos de 16 horas luz obteniendo formación de callos a las 4 semanas. De lo expuesto se demuestra que las auxinas son sensibles a la luz y a medida que el fotoperiodo aumenta las mismas se inactivan

### **5.1.2. Fase dos**

Para evaluar el efecto de Zeatina sobre el crecimiento de callos se usó 0,5ppm de Zeatina y un fotoperiodo de 24horas en el tratamiento 5 (T<sub>5</sub>) y con esta concentración se lograron callos friables de 1,5 cm en 3 semanas, a diferencia de la investigación realizada por Zhou, *et al.* (1994), la misma que indica que la mejor dosis es 0,23ppm y fotoperiodos de 18horas de luz y 6 de oscuridad logrando un crecimiento de 2 cm en 8 semanas.

La evaluación del efecto de TDZ se realizó utilizando varias concentraciones, de las cuales usando 1ppm y fotoperiodo de 24 horas se

logro un máximo de crecimiento de 1cm durante 3 semanas. Dohm, *et al.*, (2000), logró regeneración de callos en 3 meses usando 2ppm de TDZ

Con relación a los tratamientos testigo en donde no se uso citoquininas, no se obtuvo desarrollo de callos lo que se corrobora en los trabajos realizados por Chuyn *et al.* (2002), utilizando en *Matricaria recutita L* en donde no se logro crecimiento de callos. Lo señalado demuestra que las citoquininas son fitohormonas que permiten el crecimiento o división celular.

## **5.2. Suspensión celular**

La mayor cantidad de protoplastos se logró realizando cortes paralelos de 1mm de separación en el tejido foliar, también fue necesario someter al tejido al vacío y agitación en el proceso de incubación con las enzimas, lo indicado coincide con la investigación descrita por De la Torre (2007) y Osorio *et al.* (2010).

La cantidad de protoplastos por mL fue de 141 667 células/ml protoplastos. Este valor resulto mínimo en comparación con el trabajo realizado por De la Torre (2007), quien obtuvo una concentración de  $2.41 \times 10^5$  protoplastos en rosa. La diferencia en la cantidad de protoplastos en las dos especies de plantas a pesar de ubicarse dentro de la misma familia se debe fundamentalmente a: que la mora tiene diferentes características foliares, mayor cantidad de cutícula, hojas mas lignificadas, mayor porcentaje de lignina y celulosa, que son factores imprescindibles que influyen directamente en la obtención de protoplastos.

En la presente investigación después de obtener los protoplastos se coloco en un medio MS+ diferentes concentraciones de GA<sub>3</sub>

Para lograr multiplicación y división celular de protoplastos fue necesario adicionar al medio MS + Ga3 en concentración de 5ppm, con esta concentración se obtuvo 45 833 protoplastos al primer día, al día 3 y 4 días los protoplastos formaron agrupaciones en un 20% y en el 5to día el crecimiento celular se detuvo, lo que demuestró que el ácido giberélico estimula el crecimiento celular. Datos similares se obtuvieron en trabajos realizados por Andreu *et al.* (2008) para el cultivo de protoplastos del patrón ciruelo 'Mariana 2624' que se lo realiza en un medio basado en el de Quorin y Lepoivre, con mitad de concentraciones de macronutrientes, sin piridoxina ni ácido nicótico, se le añadió hidrolizado de caseína, sacarosa, manitol, ANA y BAP obteniendo al 3-4 días la iniciación de su división celular, a los 6 días se encontró un porcentaje de entre un 43 y un 70% de protoplastos en división y a los 14 días la mayoría de los protoplastos había formado grupos de 3 células pero a partir de ese momento, las divisiones se detuvieron.

Finalmente los protoplastos obtenidos se cultivaron en medio sólido (MS+ 0,5ppm 2,4D) para confirmar la viabilidad de los mismos y lograr desarrollo de callos iniciales. En la 2 semana se logró la formación de microcallos, en la semana posterior se observó una mínima proliferación obteniendo callos compactos de color cristalino y en la cuarta semana fue más evidente su proliferación debido a que se observaron pequeñas aglutinaciones que son las células que se encuentran en el callo compacto y tomando coloración blanquecina. En comparación en trabajo similares realizado por Andreu *et al.* (2008) a pesar de utilizar 2,4D que es una fitohormona que estimula a la formación de callos no logró obtener formación de mismos.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES

- Las hojas jóvenes de mora de castilla in vitro son el mejor material vegetativo para generar la formación de callos.
- Para la inducción de callos, encontrándose una diferencia significativa entre tratamientos con un valor de  $p=0,001$ , 2,4D resulto la mejor fitohormona en concentración de 0,5ppm lográndose obtener hasta 15 callos en las primeras cuatro semanas. No así la fitohormona ANA que sin importar su concentración logró un máximo de desarrolló de 6 callos.
- Las citoquininas fueron fitohormonas esenciales para el desarrollo de callos friables (viables) y de las dos utilizadas (Zeatine y TDZ) Zeatine en concentración de 0,5ppm resulto la más adecuada, logrando crecimiento de callos de hasta 5cm utilizando un fotoperiodo de 24horas.
- Para lograr crecimiento celular, encontrándose una diferencia significativa entre tratamientos con un valor de  $p=0,0493$ , el ácido giberélico en concentración de 0,5ppm fue la fitohormona más adecuada ya que permitió el desprendimiento celular, desarrollo posterior de callos de color verde friables y estabilizó el contenido celular hasta el sexto día.
- La viabilidad de los proembriones obtenidos en el cultivo celular se comprobó al introducirlos en medio sólido (MS + 0,5ppm 2,4D) en el cual se consiguió el desarrollo de microcallos.
- El protocolo para la obtención de proembriones y desarrollo de microcallos a partir de tejido foliar fue el medio MS + 0,5ppm de 2,4 D, seguido de 0,5ppm de Zeatine y finalmente para el establecimiento celular MS + 0,5 ppm de GA<sub>3</sub>.

## CAPÍTULO VII

### RECOMENDACIONES

- Tomando en cuenta que las auxinas son sensibles a la luz y las citoquininas no actúa eficientemente a oscuridad, se recomienda realizar la callogenesis en dos fases.
- Para lograr mayor biomasa celular es importante utilizar callos blandos obtenidos hasta la 4 semana
- Se recomienda utilizar 0,5ppm de Zeatine en la segunda fase de callogénesis para obtener mejores resultados.
- Para lograr una mejor multiplicación y evitar la formación de tejidos en las suspensiones celulares es recomendable utilizar 0,5ppm de GA<sub>3</sub>.
- Es importante realizar cultivos de protoplastos debido que se obtiene en menor tiempo, mayor cantidad, y es más factible su multiplicación.
- Se recomienda trabajar con MS + 0,5ppm 2,4D en oscuridad para garantizar la obtención de microcallo a partir del cultivo celular.



## CAPÍTULO VIII

### BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M., Ortiz, J., & Sandoval J. (2008). Embriogénesis Somática en Plátanos y Bananos. CATEI. CORBANA. Costa Rica. Extraído el 31 de enero, 2012, Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A2310e/A2310e.pdf>
- Andreu, P. et al. (2008). Aislamiento de protoplastos. Extraído el 25 de febrero, 2013. Disponible en: [http://digital.csic.es/bitstream/10261/11747/1/AndreuP\\_ITEA\\_2009.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/11747/1/AndreuP_ITEA_2009.pdf)
- Arbeláez, L. (2008). Micropropagación de *Rubus glaucus Benth* sin agujones en medio sólido y por inmersión temporal. Extraído el 30 de enero, 2011. Disponible en: <http://www.utp.edu.co/investigacion/proyectos/detalleProyectoHTML.php?cod=740>
- Casaca, A. (2005). El Cultivo de la Mora (*Rubus glaucus*). Secretaría de Agricultura y Ganadería. Honduras. Extraído el 04 de octubre, 2011. Disponible en: <http://www.agrifoodgateway.com/es/articles/el-cultivo-de-la-mora-rubus-glaucus>
- Castro, J & Cerdas M. (2005). Mora (*Rubus spp*) Cultivo y Manejo Poscosecha. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Universidad de

Costa Rica. Consejo Nacional de Producción. Extraído el 04 de febrero, 2012. Disponible en:

[http://www.mag.go.cr/biblioteca\\_virtual\\_ciencia/manual\\_mora\\_05.pdf](http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/manual_mora_05.pdf)

- Cerón, C. (1993). Manual de Botánica Ecuatoriana. Sistemática y Métodos de Estudio. Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador. p.3, 88.

- Chuyn, O, *et al.*, (2002). Obtención de flavonoides a partir del cultivo en suspensión en células vegetales de *Matricaria recutita* L. Revista Universidad EAFIT No 127. Extraído el 13 de abril, 2013. Disponible en:

[https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&sqi=2&ved=0CC4QFjAA&url=http%3A%2F%2Fpublicaciones.eafit.edu.co%2Findex.php%2Frevista-universidad-eafit%2Farticle%2Fdownload%2F932%2F837&ei=kMIsUcbmI5Gc8gTy6lDwCA&usg=AFQjCNEkp8Rc2ZYWw6qY9q6tnY7avW1\\_Ug&sig2=chr9BZLr8HhQpGPhE9EfMg&bvm=bv.45175338,d.eWU](https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&sqi=2&ved=0CC4QFjAA&url=http%3A%2F%2Fpublicaciones.eafit.edu.co%2Findex.php%2Frevista-universidad-eafit%2Farticle%2Fdownload%2F932%2F837&ei=kMIsUcbmI5Gc8gTy6lDwCA&usg=AFQjCNEkp8Rc2ZYWw6qY9q6tnY7avW1_Ug&sig2=chr9BZLr8HhQpGPhE9EfMg&bvm=bv.45175338,d.eWU)

- Conceptos Básicos Del Cultivo de Tejidos Vegetales. Extraído el 22 de enero, 2013. Disponible en:

[http://books.google.com.ec/books?id=T9QOAQAIAAJ&pg=PA28&lpg=PA28&dq=evaluacion+de+crecimiento+de+celulas+en+suspensi%C3%B3n&source=bl&ots=p35WH7Hheh&sig=9ymPI6\\_a5GfpgLVH\\_e-M0hK0P4s&hl=es&sa=X&ei=6rgAUYZiO7OM0QH\\_tIHwAg&ved=0CFkQ6AEwBg#v=onepage&q=evaluacion%20de%20crecimiento%20de%20celulas%20en%20suspensi%C3%B3n&f=false](http://books.google.com.ec/books?id=T9QOAQAIAAJ&pg=PA28&lpg=PA28&dq=evaluacion+de+crecimiento+de+celulas+en+suspensi%C3%B3n&source=bl&ots=p35WH7Hheh&sig=9ymPI6_a5GfpgLVH_e-M0hK0P4s&hl=es&sa=X&ei=6rgAUYZiO7OM0QH_tIHwAg&ved=0CFkQ6AEwBg#v=onepage&q=evaluacion%20de%20crecimiento%20de%20celulas%20en%20suspensi%C3%B3n&f=false)

- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Sánchez, S, *et al.* (2011). Dinámica de crecimiento celular de *Beta vulgaris L.* cultivada *in vitro* mediante análisis digital de imágenes y de la dimensión fractal. INTERCIENCIA. VOL. 36 N° 5. Extraído el 27 de octubre, 2012. Disponible en: [http://www.interciencia.org/v36\\_05/392.pdf](http://www.interciencia.org/v36_05/392.pdf)
- Dohm, A. *et al.* (2000). Somatic Embryogenesis in Rose. Institute for Ornamental Plant Breeding. Germany. Extraído el 27 de octubre, 2011. Disponible en:  
  
[http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=547\\_40](http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=547_40)
- Fernández, O. *et al.* (2002). Obtención de flavonoides a partir del Cultivo en Suspensión de células vegetales de *Matricaria recutita L.* Universidad Eafit, Medellín. Colombia. Número 127. Pp: 65-71
- Franco G & Giraldo M. Cultivo de Mora. Extraído el 17 de enero, 2012. Disponible en:  
  
[http://www.agronet.gov.co/www/docs\\_si2/Cultivo%20de%20la%20mora.pdf](http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/Cultivo%20de%20la%20mora.pdf)
- Freire M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Santa Clara. Cuba. Extraído el 02 de octubre, 2011. Disponible en: <http://revista.ibp.co.cu/2003/170-aspectos-basicos-de-la-embriogenesis-somatica-.html>

- González, E. (1997). La producción de mora de Castilla en el Táchira (En línea). Consultado 27 oct. 2011. Disponible en:

[http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_tec/FonaiapDivulga/fd56/mora.htm](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd56/mora.htm).

- González, M. *et al.* (2010). Influencia de la Edad del Callo en la Inducción de Suspensiones Celulares de Cafeto. Universidad Autónoma del Estado de México. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. Extraído el 07 de noviembre, 2011. Disponible en:

<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=43720093009>

- Hurtado, D & Merino, M. (2001). Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas. Edición Sexta. México. Pp: 48-64, 93-99 y 122-130.
- Lallana, V.H. & Lallana Ma. Del C. (2003). Manual de prácticas de fisiología vegetal. Edición digital. UNER. Pp. 81. Extraído el 12 de septiembre, 2012. Disponible en:

[http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/fisiologiaveg/m\\_didactico/manual\\_practicas/BDesarrolloED.pdf](http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/fisiologiaveg/m_didactico/manual_practicas/BDesarrolloED.pdf)

- Manual de Cultivo de Mora. Extraído el 20 de octubre, 2011. Disponible en: [http://www.funtha.gov.ve/doc\\_pub/pub\\_7.pdf](http://www.funtha.gov.ve/doc_pub/pub_7.pdf)
- Martínez, A. (2012). Biología VII semestre. Técnicas in vitro en el cultivo de tejidos vegetales. Instituto Tecnológico de CD. Altamiran. Extraído el 23 de enero, 2013. Disponible en:

<http://martinezurbina.blogspot.com/2012/11/instituto-tecnologico-de-cd.html>

- Marulanda, M. (2001). Establecimiento *in vitro* de heliconias con fines de producción masiva. Scientia et Technica Año x, No 26, Diciembre 2001. UTP. ISSN 0122-1701
- Mejía, P. (2011). Caracterización morfoagronómica de Genotipos de mora (*Rubus glaucus Benth*) en la granja Experimental Tumbaco – Iniap. E.S.P.E. Ecuador. Extraído el 02 de enero, 2012. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/3863>.
- Molina, E & Gómez, I. (1997). La producción de mora de castilla en el Táchira. FONAIAP Divulga No. 56. Extraído el 25 de enero, 2013. Disponible en:  
  
[http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_tec/FonaiapDivulga/fd56/mora.htm](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd56/mora.htm)
- Montalvo, D. (2010). “Evaluación de la calidad pos cosecha de las accesiones seleccionadas de mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*) provenientes de las provincias de Tungurahua y Bolívar”. Extraído el 18 de febrero, 2012. Disponible en:  
  
<http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/2653/1/CD-3336.pdf>.
- Monteiro, M. (2004). Berries del Uruguay. Extraído el 30 de octubre. 2011. Disponible en: <http://usuarios.netgate.com.uy/cmonteiro/moras.htm>

- Palaguachi, A. (2011). El comercio. Extraído el 18 de diciembre,2012. Disponible en: [http://www.elcomercio.com/agromar/tipos-moras-pais\\_0\\_618538260.html](http://www.elcomercio.com/agromar/tipos-moras-pais_0_618538260.html)
- Pati, P.K., Sharma M., Sood A. & Ahuja PS. (2004). Direct shoot regeneration from leaf explants of Rosa Damascena Mill. BioOne 2010 US/Canada, Volume 40, Issue 2, March 2004 pp. 192-195.
- Paucar, A. (2011). Organogénesis directa in vitro a partir de explantes de hojas de mora (*Rubus glaucus Benth*). Extraído el 18 de diciembre, 2012. Disponible en :  
  
<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5134/1/T-ESPE-IASA%20I-004590.pdf>
- Pérez, J. (2009). Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales en *Phaseolus* sp. Extraído el 08 de febrero, 2012. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos67/cultivo-tejidos-vegetales/cultivo-tejidos-vegetales2.shtml?monosearch>
- Prieto, V. (2010). Producción de Mora se incrementa. Diario HOY. Ecuador. Extraído el 08 de febrero, 2012. Disponible en: <http://www.hoy.com.ec/noticias-ecuador/produccion-de-mora-se-incrementa-393355.html>
- Ramírez T, et al. (2009). Perfil de Mora. CORPEI. Extraído el 18 de noviembre, 2011. Disponible en: <http://www.pucesi.edu.ec/pdf/mora.pdf>
- Reina, C. (1998). Manejo post cosecha y evaluación de la calidad para la mora de Castilla (*Rubus glaucus*) que se comercializa en la ciudad de Neiva. Extraído el 25 de febrero, 2012. Disponible en:

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

- Rivero, M. (2011). Cultivo de tejidos vegetales I. Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Extraído el 01 de diciembre, 2012. Disponible en:

[http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/agbt/teoricos/2011\\_2%20Cultivo%20de%20Tejidos%20I.pdf](http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/agbt/teoricos/2011_2%20Cultivo%20de%20Tejidos%20I.pdf)

- Roa, S. (2006). Primer curso de actualización de conocimientos en frutales de altura: fresa, mora y durazno. San Cristóbal. Extraído el 10 de noviembre. 2011. Disponible en:

<http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=origen%20y%20generalidades%20de%20la%20mora%20de%20castilla&source=web&cd=6&ved=0CEUQFjAF&url=http%3A%2F%2Fwww.ucla.edu.ve%2Fdagronom%2Fsovefru%2FMemoria%2520curso%2520frutales%2520de%2520altura.doc&ei=JtwaT7PwLs7BgAfb6viAAQ&usg=AFQjCNErgSthIddUOdMBj6pvPfrOXJ8HfQ>

- Roca, W. et al. (1991). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali. Colombia. Extraído el 19 de noviembre. 2010. Disponible en:

<http://books.google.com.ec/books?id=EXijYNw55DUC&printsec=frontcover&dq=Cultivo+de+tejidos+en+la+agricultura&hl=es&sa=X&ei=OOIcT666lpL4gAegg9HXCw&ved=0CDcQ6AEwAA#v=onepage&q=Cultivo%20de%20tejidos%20en%20la%20agricultura&f=false>

- Segretín, E. (2006). Consejo argentino para la información y el desarrollo de la Biotecnología ARGENBIO. Extraído el 30 de noviembre. 2011. Disponible en:

<http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf>

- Smith, M. (2008). Acodo. Manual de Reproducción Vegetal. Editorial Omega. Pág: 98-99. Extraído el 23 de enero. 2013.
- Trang, B, *et al.* (2000). Crecimiento de las suspensiones celulares del cv. 'Cauman. *InfoMusa* - Vol. 13 - No.1. Extraído el 03 de octubre. 2011. Disponible en: [http://www.musalit.org/pdf/IN040406\\_es.pdf](http://www.musalit.org/pdf/IN040406_es.pdf)
- Wikipedia. (2012). Bioreguladores. Extraído el 12 de diciembre. 2012. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Biorregulador>.