



**UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL**

**FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO  
CARRERA: INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**TÍTULO:  
OBTENCIÓN DE MORA TROPICALIZADA *in vitro* UTILIZANDO  
ENDOSPERMO DE COCO Y FITOHORMONAS**

**AUTOR  
ULLOA CARRASCO DANNY PATRICIO**

**PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO  
AGROPECUARIO CON MENCIÓN EN GESTIÓN EMPRESARIAL  
AGROPECUARIA**

**TUTOR:  
MOREIRA MACÍAS RICARDO GONZALO**

**Guayaquil, Ecuador  
2015**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL**

**FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO  
CARRERA: INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**CERTIFICACIÓN**

Certificamos que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por DANNY PATRICIO ULLOA CARRASCO, como requerimiento parcial para la obtención del Título de INGENIERO AGROPECUARIO CON MENCIÓN EN GESTIÓN EMPRESARIAL AGROPECUARIA.

**TUTOR**

\_\_\_\_\_  
**ING. RICARDO GONZALO MOREIRA MACÍAS M.Sc**

**DIRECTOR DE LA CARRERA**

\_\_\_\_\_  
**ING. JOHN ELOY FRANCO RODRÍGUEZ M.Sc**

**Guayaquil, a los 17 días del mes de Marzo del 2015**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL**

**FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO  
CARRERA: INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD**

**Yo, Danny Patricio Ulloa Carrasco**

**DECLARO QUE:**

El Trabajo de Titulación: OBTENCIÓN DE MORA TROPICALIZADA *in vitro* UTILIZANDO ENDOSPERMO DE COCO Y FITOHORMONAS, previa a la obtención del Título de INGENIERO AGROPECUARIO CON MENCIÓN EN GESTIÓN EMPRESARIAL AGROPECUARIA, ha sido desarrollado respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi total autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del Trabajo de Titulación referido.

**Guayaquil, a los 17 días del mes de Marzo del 2015**

**EL AUTOR**

---

**Danny Patricio Ulloa Carrasco**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL**

**FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO  
CARRERA: INGENIERÍA AGROPECUÁRIA**

**AUTORIZACIÓN**

**Yo, Danny Patricio Ulloa Carrasco**

Autorizo a la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, la **publicación** en la biblioteca de la institución del Trabajo de Titulación: **OBTENCIÓN DE MORA TROPICALIZADA *in vitro* UTILIZANDO ENDOSPERMO DE COCO Y FITOHORMONAS**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y total autoría.

**Guayaquil, a los 17 días del mes de Marzo del 2015**

**EL AUTOR:**

---

**Danny Patricio Ulloa Carrasco**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por darme la sabiduría, la salud y la fortaleza para continuar con esta dura lucha que es ser profesional.

A mis padres el Dr. Edgar Ulloa Parada y Dra. María Carrasco Quito, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que incluyo este. Me formaron con reglas y con algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos. A mis hermanos Edgar, Susana, Mariela, Jemmy. A mis cuñados Marjorie, Byron

A mi esposa Alba Moncada y a mi futuro hijo Danny Jr. Por apoyarme con amor y creer en mí, hoy hemos alcanzado un triunfo más.

A los: Ing. Laura Parismoreno Rivas, Ing. Ricardo Moreira, Ing. Arturo Álvarez, Ing. Manuel Donoso, Ing. Jhon Franco y a todos los docentes de la Facultad Técnica para el Desarrollo de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil por haberme enseñado, apoyado y comprendido en todo este camino de preparación.

Al alcalde Andrés Macías Castillo por haberme dado la oportunidad y el tiempo para terminar mi carrera.

**Danny Patricio Ulloa Carrasco**

## **DEDICATORIA**

Tú, que has sido más que mi padre mi amigo y mano derecho durante toda mi vida; te agradezco por tu desinteresada ayuda, por darme la mano cuando siempre la necesite, por aportar considerablemente en todo este duro proceso. Te agradezco no solo por la ayuda brindada, sino por los buenos momentos que convivimos.

Gracias por tus enseñanzas, por las presiones y tus mensajes de aliento y tu excelente manera de instruirme para afrontar las verdades de esta vida. En este reto Universitario fuiste concluyente, no lo hubiera podido hacer sin tu ayuda.

Eres una gran persona, y me siento muy orgulloso de ser tu hijo.

Dr. Edgar Daniel Ulloa Parada (primera promoción de médicos de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil)

**Danny Patricio Ulloa Carrasco**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL**

**FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO  
CARRERA: INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**CALIFICACIÓN**

---

**ING. RICARDO GONZALO MOREIRA MACÍAS M.Sc**

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Páginas
AGRADECIMIENTO .....	iv
DEDICATORIA .....	v
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT .....	xii
Índice General .....	vii
Índice de Tablas .....	ix
Índice de Gráficos .....	x
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivo General .....	2
1.2 Objetivos Específicos.....	2
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
2.1 Clasificación taxonómica .....	3
2.1.1 Descripción morfológica.....	3
2.2 Requerimientos edafoclimáticos .....	3
2.3 Variedades.....	4
2.3.1 Mora de castilla ( <i>Rubus glaucus</i> ).....	4
2.3.2 Mora tropical ( <i>Rubus brasus</i> ).....	4
2.4 Composición nutricional .....	4
2.5 Cultivo <i>in vitro</i> .....	5
2.6 Composición del medio de cultivo.....	6
2.7 Métodos de clonación .....	10
2.7.1 Tipos de cultivo <i>in vitro</i> .....	10
2.7.2 Regeneración y morfogénesis .....	11
2.7.2.1 Generalidades .....	11
2.7.2.2 Tipos de morfogénesis .....	11
2.7.2.2.1 Embriogénesis somática.....	12
2.7.2.2.2 Organogénesis .....	12
2.8 Requerimientos hormonales.....	13
2.8.1 Los fitorreguladores .....	13
2.9 Endospermo de coco (Agua de coco).....	15
2.9.1 Composición del agua de coco AC .....	16

Contenido	Páginas
<b>3. MARCO OPERACIONAL</b> .....	17
3.1. Ubicación .....	17
3.2. Datos geográficos .....	17
3.3. Datos climáticos .....	17
3.4. Duración .....	17
3.5. Materiales .....	17
3.5.1. De laboratorio .....	17
3.5.2. Material experimental .....	18
3.5.3. Biorreguladores .....	18
3.5.4. Sustancias orgánicas .....	18
3.6. Tratamientos en estudio .....	18
3.7. Características de los tratamientos .....	18
3.8. Diseño experimental .....	19
3.9. Análisis de varianza .....	19
3.10. Análisis funcional .....	19
3.11. Métodos .....	19
3.12. Variables evaluadas .....	23
3.12.1. Números de brotes por explante .....	23
3.12.2. Longitud de brotes por explante .....	23
3.12.3. Longitud de hojas por explante .....	23
3.12.4. Número de raíces por explante .....	23
<b>4. RESULTADOS</b> .....	24
4.1. Números de brotes por explante .....	24
4.2. Longitud de brotes por explante .....	25
4.3. Longitud de hojas por explante .....	26
4.4. Número de raíces por explante .....	27
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	28
<b>6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	30
6.1. Conclusiones .....	30
6.2. Recomendaciones .....	30
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	31
<b>GLOSARIO</b> .....	36
<b>ANEXOS</b> .....	39
<b>TABLAS</b> .....	40
<b>GRÁFICOS</b> .....	50

## ÍNDICE DE TABLAS.

Contenido	Páginas
Tabla 1: Composición nutricional de la mora .....	06
Tabla 2: Clasificación de los factores que pueden afectar al crecimiento y morfogénesis de las plantas in vitro .....	10
Tabla 3: Materiales de laboratorio .....	18
Tabla 4: Análisis de varianza (ANDEVA).....	20
Tabla 5: Composición de sales básicas usadas en la preparación del medio de cultivo (WPM).....	22
Tabla 6: Sustancias utilizadas para elaborar el medio de cultivo.....	23
Tabla 7: Número de brotes a los 30, 60 y 90 días .....	25
Tabla 8: Longitud de brotes a los 30, 60 y 90 días .....	26
Tabla 9: Longitud de hojas a los 30, 60 y 90 días.....	27
Tabla 10: Número de raíces después de cada replica a los 90 días.....	28
Tabla 1A: Análisis de varianza de número de brotes a los 30 días.....	41
Tabla 2A: Análisis de varianza de número de brotes a los 60 días.....	42
Tabla 3A: Análisis de varianza de número de brotes a los 90 días.....	43
Tabla 4A: Análisis de varianza de longitud de brotes a los 30 días.....	44
Tabla 5A: Análisis de varianza de longitud de brotes a los 60 días.....	45
Tabla 6A: Análisis de varianza de longitud de brotes a los 90 días.....	46
Tabla 7A: Análisis de varianza de longitud de hojas a los 30 días .....	47
Tabla 8A: Análisis de varianza de longitud de hojas a los 60 días .....	48
Tabla 9A: Análisis de varianza de longitud de hojas a los 90 días .....	49
Tabla10A: Análisis de varianza de número de raíces a los 90 días .....	50

## ÍNDICE DE GRAFICOS.

Contenido.	Páginas
Gráfico 1: Área de siembra .....	51
Gráfico 2: Planta madre de mora Rubus brasus .....	51
Gráfico 3: Selección y corte de brotes iniciales en plantas madres .....	52
Gráfico 4: Tamaño de brotes ya cortados a nivel de campo .....	52
Gráfico 5: Transporte de brotes iniciales en horas de la mañana hasta el laboratorio .....	53
Gráfico 6: Brotes in vivo para su reducción y desinfección en el laboratorio.....	53
Gráfico 7: Explantes ya sumergidos en los desinfectantes para luego ser lavados en asepsia .....	54
Gráfico 8: Explantes de mora sembrados en el medio de cultivo inicial .....	54
Gráfico 9: Explantes listos para ser seleccionados por sanidad (hongos y bacterias) .....	55
Gráfico10: Demostración del desarrollo de explantes ya en los tratamientos.....	55
Gráfico11: Desarrollo de explantes de mora en el fitotrón y su ubicación respectiva de los tratamientos .....	56
Gráfico12: Vitroplantas de mora desarrollada caulinarmente y radicularmente.....	56

## RESUMEN

Durante el periodo comprendido entre octubre del 2014 y febrero del 2015 se llevó a cabo el presente estudio que tuvo como finalidad desarrollar un protocolo para la propagación *in vitro* para la obtención de plántulas de mora tropical de la variedad *brasus*. El estudio se ejecutó en el Laboratorio de cultivo Agrovitoparis en la Provincia del Guayas, Cantón Guayaquil, Parroquia Tarqui, avenida Juan Tanca Marengo Km 4 ½, Ecuador.

Los objetivos de la investigación fueron evaluar el medio de cultivo utilizando endospermo de coco y fitohormonas como 6-bencilaminopurina (6-BAP), y ácido indolbutírico (AIB) sobre la inducción de raíces y brotes de las vitroplantas. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar (DCA), con cuatro tratamientos, y 10 réplicas. Se utilizó la diferencia mínima significativa entre los medios del tratamiento.

En esta investigación se incluyeron los siguientes tratamientos: T1 (WPM + 50 ml/l endospermo de coco), T2 (WPM+80ml/l endospermo de coco+1mg/l de 6- bencilaminopurina (6-BAP), T3 (WPM+100ml/l endospermo de coco+2mg/l 6- bencilaminopurina (6-BAP)+0.25mg/l ácido indolbutírico (AIB) y T4 (WPM; testigo convencional).

El cultivo fue evaluado bajo las siguientes variables: número de brotes por explante (mm), longitud de brotes por explante (mm), longitud de hojas por explante (mm), número de raíces por explante (mm). En la fase de multiplicación se encontró que la dosis óptima de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y endospermo de coco fueron 2 mg/l y 80 mg/l respectivamente.

Se encontró que en la fase de enraizamiento, la adición de 0.25 mg/l de ácido indolbutírico (AIB) promovió el 100 % de vitroplantas enraizadas.

## ABSTRACT

During the period between October 2014 and February 2015 was conducted the present study that aimed to develop a protocol for in vitro propagation of mulberry plants tropical *Brasus* variety. The research was carried out in the laboratory agrovitoparis culture in the Guayas Province, Canton Guayaquil; Parish Tarquinia, Av Juan Tanca Marengo Km 4 ½, Ecuador.

The research objectives were assess the culture medium using coconut endosperm, 6 -benzylaminopurine (BAP), indole butyric acid (IBA) on the induction of roots and shoots of the plantlets. The experimental design was completely randomized (CRD) with 4 treatments and 10 replicates. We used the least significant difference between means of treatment.

This research included the following treatments: T1 (WPM+50 ml/l coconut endosperm), T2 (WPM+80 ml/l coconut endosperm+1 mg/l of 6-benzylaminopurine (BAP), T3 (WPM+100 ml/l coconut endosperm +2mg/l 6-benzylaminopurine (6-BAP) + 0.25 mg/l indolebutyric acid (AIB), T4 (WPM; conventional witness).

The cultivate was evaluated under the following variables: number of shoots per explant (mm), length of shoots per explant (mm), length of leaves per explant (mm), number of roots per explant (mm).the multiplication phase was found that the optimal dose of 6-benzylaminopurine (6-BAP) and coconut endosperm were 2 mg/l y 80 mg/l respectively.

We found that in the rooting phase, the addition of 0.25 mg/l indole butyric acid (IBA) promoted 100 % rooted plantlets.

## 1. INTRODUCCIÓN

La mora *Rubus* sp, es originaria de las zonas altas tropicales de América, es una de las especies de mayor diseminación en zonas tropicales y subtropicales y es económicamente importante en ciertos países del mundo. Se cultiva de forma comercial principalmente en Estados Unidos, Colombia, Ecuador, Brasil, Guatemala, Perú y México entre otros. En el Ecuador la especie de mora *Rubus glaucus* es la de mayor importancia económica, el cultivo se desarrolla en la región sierra; y la especie *Rubus brasus* se considera más adecuado el trópico y subtrópico, principalmente en las provincias de Pichincha, Guayas y Bolívar (Proyecto SICA, 2006).

El cultivo de la mora en el Ecuador presenta bajo rendimiento, debido principalmente a los métodos de propagación habituales que es sexual y asexual. En forma sexual las plantas de mora tienen los inconvenientes de poseer bajo poder de germinación y el crecimiento de las plantas es muy lento, además la recolección de diminutas semillas, la preparación, la siembra y todos los cuidados que la técnica requiere, no compensa la inversión y el tiempo utilizado. La propagación asexual se da por estolones, raíces, estacas y acodo, este tipo de proceso facilita la diseminación de plagas y enfermedades que afectan la cantidad y calidad de la producción. Además, con estos métodos el número de plantas homogéneas que se pueden obtener de cada planta madre es reducido al propagar las plantas (Monteiro, 2004).

La biotecnología ofrece alternativas rápidas y eficientes al mejoramiento genético de plantas, esto permite la obtención de cultivares tolerantes a factores adversos, o portadores de atributos que superen a los convencionales, principalmente en cuanto a calidad y rendimiento. El tiempo, la mano de obra y el espacio, han demostrado que son reducidos a más de la mitad de lo requerido por los métodos tradicionales (Arbeláez, 2008).

En los últimos años se ha logrado un gran progreso en el desarrollo de sistemas *in vitro* para la inducción y desarrollo de yemas apicales y axilares en el cultivo de mora

tropical utilizando fitohormonas y sustancias químicamente no definidas. Esto ha sido posible debido al desarrollo de técnicas apropiadas de manipulación aséptica como un efecto de la comprensión de los eventos fisiológicos, genéticos y bioquímicos que ocurren durante la clonación in vitro, lo cual ha sido esencial para el diseño de nuevos protocolos que permitan seguir mejorando este proceso morfogénico.

Las investigaciones dentro de este contexto permiten no sólo elevar el nivel de conocimiento sobre los eventos que producen durante su desarrollo de la inducción de yemas, sino que también permite reducir el nivel de empirismo sobre el manejo de la morfogénesis y así aumentar la probabilidad de éxito en los pronósticos de regeneración de plantas clonadas y/o transformadas.

Tomando en consideración los beneficios que tiene la multiplicación in vitro y ante la necesidad que se tiene de establecer una técnica eficiente para la propagación de mora, se investigó como desarrollar un protocolo para la obtención de plantas in vitro de mora tropicalizada utilizando endospermo de coco y fitohormonas. Este procedimiento presentó una elevada tasa de propagación del material vegetal con características homogéneas y libres de patógenos, apoyando de esta forma el desarrollo de este importante sector frutícola del país, para el que se plantearon los siguientes objetivos:

### **1.1 Objetivos General.**

1. Obtener masivamente plantas in vitro de mora tropical (*Rubus Brasus*) listas para su adaptación in vivo.

### **1.2 Objetivos Específicos.**

- Evaluar en medio de cultivo, la dosis de endospermo de coco y su efecto sobre la inducción de brotes y hojas.
- Determinar en medio de cultivo, las dosis óptimas de 6-bencilaminopurina (6-BAP), y el Ácido indolbutírico (AIB) sobre la inducción de raíces y brotes de las vitroplantas.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Clasificación taxonómica.

La clasificación taxonómica de la mora es la siguiente:

- Reino:** Vegetal.  
**Clase:** Dicotiledónea.  
**Subclase:** Arquiclamídea.  
**Orden:** Rosales.  
**Familia:** Rosáceas.  
**Género:** *Rubus*.  
**Especie:** *brasus*.

Fuente: Bejarano, 1992.

#### 2.1.1 Descripción morfológica.

La mora es un arbusto perenne que alcanza varios metros de altura, en el cual el tronco se divide en varias ramas de color cenizo, alargadas, poco ramificadas y con un número considerable de espinas, las hojas son compuestas de tres a cinco hojuelas, tienen peciolos largos y son pubescentes; las flores son de color blanco y blanco rosado; el fruto es múltiple o colectivo de forma cónica que al madurar adquiere un color rojo oscuro que se torna morado (Reina, 1998).

### 2.2 Requerimientos Edafoclimáticos.

Según Martínez (2007), la temperatura promedio para cultivar mora es de 25 °C y una temperatura baja promedio de 16 °C.

Para un óptimo desarrollo la mora tropical se debe cultivar entre los 0 y 1 200 m.s.n.m., aunque puede tolerar un amplio rango de altitudes. Requiere de una

generalización pluvial de 1 500 a 2 500 mm al año bien distribuidas y una humedad relativa del 70 al 80 % (Infoagro, 2014).

La mora se desarrolla mejor en suelos franco arcillosos, de modo que permita una adecuada reserva de agua y el exceso sea evacuado fácilmente, con alto contenido de materia orgánica y ricos en fósforo y potasio. Deben presentar buen drenaje tanto interno como externo, ya que es una planta altamente susceptible al encharcamiento. El pH que requiere está en el rango que va de 5.2 – 6.7, siendo 5.7 el óptimo (Infoagro, 2014).

### **2.3 Variedades.**

**2.3.1** Mora de Castilla (*Rubus glaucus*), los frutos son de forma larga y cónica, de color morado brillante, se le conoce también como Mora andina es la que más se cultiva en el país, además representa el mayor consumo interno y externo. (Infoagro, 2014).

**2.3.2** Mora Tropical (*Rubus brasus*), la planta es vigorosa de crecimiento semi-erecto, el fruto es grande y muy sensible, tiene maduración tardía. El fruto es muy perecedero, por lo que necesita un adecuado manejo tanto durante la cosecha como en el proceso de pos cosecha (Martínez, 2007).

### **2.4 Composición Nutricional.**

Según Carmona (2006) la mora contiene algunos componentes nutricionales que se exponen en la (Tabla 1). El consumo de la mora es importante porque:

- Tiene un alto contenido de antocianinas y carotinoides, que son antioxidantes, los cuales neutralizan la acción de los radicales libres que son nocivos para el organismo, con lo cual se producen efectos antiinflamatorios y acción antibacteriana, y
- Posee un alto contenido de vitamina C y además de tener altas cantidades de fibra (Natural medicina, 2014)

Además la ingesta de la mora potencia nuestro sistema inmunológico y contribuye a reducir el riesgo de enfermedades degenerativas, cardiovasculares e incluso del cáncer. (Oregón Caneberry Comisión and Blackberry Comisión, 2002).

Tabla 1. Composición nutricional de la mora según (Carmona, 2006).

<b>Mora comestible: 90 % pulpa sin semillas</b>	
Factor nutricional	Contenido
Ácido Ascórbico	17 mg
Agua	97.6 g
Calcio	38 mg
Calorías	58 g
Carbohidratos	10.2 g
Cenizas	0.4 g
Fibra	4.3 g
Fósforo	40 mg
Grasa	0.6 g
Hierro	2.2 mg
Proteínas	1.2 g
Rivoflamina	0.03 mg
Tiamina	0.01 mg

Fuente: (Natural medicina, 2014).

### **2.5 Cultivo *in vitro*.**

El cultivo *in vitro* se define como el cultivo en un medio nutritivo, en condiciones estériles, de plantas, semillas, embriones, tejidos y células vegetales. La técnica del cultivo *in vitro* (también llamada micro propagación) se caracteriza principalmente por:

1. Se realiza a una escala muy pequeña, sobre una superficie relativamente reducida.
2. Optimiza las condiciones ambientales en lo que se refiere a humedad, temperatura y nutrición.
3. Excluye todos los microorganismos (hongos, bacterias) así como las plagas (insectos y nemátodos) (Margara, 1988).

Es una técnica que presenta un alto costo de instalación y precisa de personal técnico especializado. El cultivo *in vitro* tiene que ser aséptico, lo que implica la esterilización previa de los tejidos y su extracción aséptica, así como el establecimiento de condiciones que permitan mantener los cultivos resguardados de posibles contaminaciones. Dentro del proceso de micro propagación se diferencian cinco etapas, las cuales se enumeran:

Etapla 0: Mantenimiento y preparación de la planta madre.

Etapla 1: Siembra y establecimiento de los tejidos u órganos iniciales en condiciones estériles.

Etapla 2: Fase de multiplicación.

Etapla 3: Enraizamiento de los micros esquejes en condiciones estériles.

Etapla 4: Adaptación de las micro plantas a condiciones de cultivo normales (Hartman, 1984).

## **2.6 Composición del medio de cultivo.**

El medio de cultivo consiste en una mezcla de determinadas sustancias sobre o dentro del cual crecen los explantes. Son combinaciones de sustancias químicas que los investigadores han descrito después de numerosos experimentos y que permiten que las plantas crezcan y se multipliquen *in vitro* López, (1990) indica que en general los medios de cultivo se encuentran constituidos por los siguientes compuestos:

- Sales Inorgánicas.
  - a) Macronutrientes. Además del carbono, hidrógeno y oxígeno, los elementos más demandados por las plantas son: nitrógeno, potasio y fósforo.
  - b) Micronutrientes. Los más importantes son hierro, manganeso, zinc, boro, cobalto y molibdeno y son fundamentales para la síntesis de la clorofila así como en función de los cloroplastos.
- Agentes Quelatos. Son compuestos orgánicos capaces de formar complejos con cationes metálicos, en los cuales el metal es sostenido por medio de enlaces. Son

moléculas que retienen un ión de metal con varias uniones químicas al formar un complejo en forma lineal o de anillo ácido etilendiaminotetra acético (López, 1990) y (George, 1993).

- Vitaminas. Estas se requieren en la realización de una serie de reacciones catalíticas en los sistemas enzimáticos y se usan en pequeñas cantidades. Las más utilizadas son: tiamina (vitamina B1) que es la única realmente esencial en casi todos los tejidos vegetales, ácido nicotínico (niacina), piridoxina (vitamina B6), ácido pantoténico que ayuda en el crecimiento de ciertos tejidos, el ácido fólico disminuye la proliferación de tejido en la oscuridad mientras que en la luz la aumenta, la riboflavina, (vitamina E) ayuda en la formación de callos y mioinositol y no es propiamente una vitamina sino un azúcar – alcohol que ayuda a la formación de varios constituyentes celulares como el ácido ascórbico y la pectina, además de otros compuestos que intervienen en la división celular (López, 1990) (Salgado-Garciglia *et al.*, 1997)
- Aminoácidos. Se utilizan como fuente de nitrógeno, la glicina es el único aminoácido usado en medios de cultivo para células vegetales, la caseína hidrolizada se emplea para enriquecer en nitrógeno el medio de cultivo y otros como la arginina, l-metionina, glutamina y asparagina (Salgado-Garciglia *et al.*, 1997).
- Reguladores de crecimiento (Ver apartado 2.8).
- Carbohidratos. Se utilizan como fuente de energía y reguladores osmóticos. La sacarosa es la mejor fuente de carbono (George, 1993), y es el azúcar más empleada, le siguen la glucosa, maltosa, rafinosa, fructuosa y galactosa, manosa y lactosa (López, 1990). Se adiciona usualmente en cantidades de 20 a 45 g/l; al esterilizar el medio se obtiene la combinación de sacarosa, D- glucosa y D –fructuosa (Salgado-Garciglia *et al.*, 1997).
- Agentes gelificantes. El agar se ha empleado como soporte de los medios sólidos y semisólidos, es un derivado del alga marina, siendo un polisacárido con una elevada masa molecular que tiene capacidad de gelificar los medios (Pierik, 1990).

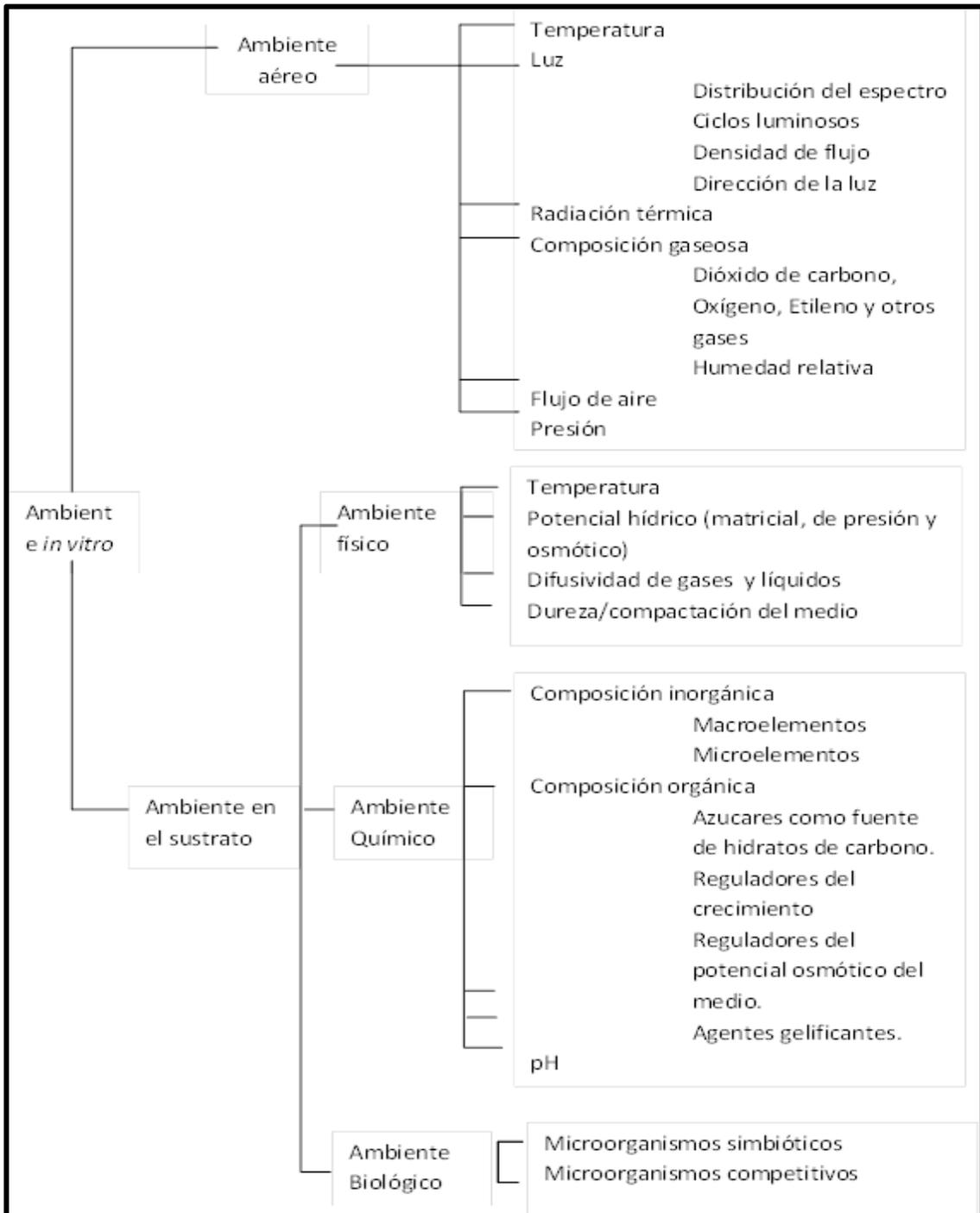
Generalmente se emplea agar- agar a una concentración de 0.5 a 0.6 %. Se ha estudiado el efecto de la concentración y marca comercial de agar, los resultados indican que no existe una correlación entre las características y crecimiento de las plantas (Cañal *et al.*, 1999).

- Agua. Es el compuesto más abundante (95 %) del medio de cultivo, por lo tanto la purificación es necesaria, la misma que se lleva a cabo por destilación, por intercambio de iones y por ósmosis inversa (George, 1993). Se utiliza agua destilada, bidestilada y desionizada.

Por otra parte las tasas de crecimiento, desarrollo y muchas de las características fisiológicas y morfológicas de las plantas desarrolladas *in vitro* están influenciadas por el ambiente físico, químico y gaseoso de los recipientes (Montoliu, 2009).

Este mismo grupo de investigadores hace una clasificación de los factores que pueden afectar al crecimiento y morfogénesis de las plantas *in vitro* como se detalla en el siguiente diagrama, en el cual se mencionan que los fenómenos que controlan los cambios ambientales en el interior de un recipiente de cultivo son similares a los que ocurren en el interior de un invernadero, ya que de hecho un recipiente de cultivo, es hasta cierto punto, un invernadero en miniatura mantenido en condiciones asépticas.

Tabla 2: Clasificación de los factores que pueden afectar al crecimiento y morfogénesis de las plantas *in vitro*.



Fuente: Montoliu & Vidal, 2009.

## 2.7 Métodos de clonación.

### 2.7.1 Tipos de cultivo *in vitro*.

Existen diferentes tipos de cultivo *in vitro* que están ligados a una serie de factores como la especie, los medios de cultivo o las condiciones ambientales; Pierik (1990) sostiene que estos tipos de cultivos son los siguientes:

- **Cultivo de plantas intactas:** Se siembra la semilla *in vitro*, obteniéndose primero una plántula y finalmente una planta.
- **Cultivo de embriones:** Se cultiva el embrión aislado después de retirar el resto de los tejidos de la semilla.
- **Cultivo de un órgano aislado:** Se pueden distinguir distintos tipos, por ejemplo: cultivo de meristemas, cultivo de ápices del vástago, cultivo de raíces, cultivo de anteras, entre otros. Generalmente una porción (de tejido, o un órgano), aislada de una planta, se denomina explante, y a su cultivo, cultivo de explante.
- **Cultivo de callo:** Se llama así, cuando una porción de tejido se desdiferencia *in vitro*, originando un callo.
- **Cultivo de células aisladas:** Es el crecimiento de células individuales, obtenidas de un tejido, callo o cultivo en suspensión, con la ayuda de enzimas o mecánicamente.
- **Cultivo de protoplastos:** Se obtiene a partir de células por digestión enzimática de la pared celular.

Por otro lado, de Pierik (1990), distinguía tres tipos de cultivos *in vitro* en plantas superiores, las cuales se indican:

- **Organizado:** Se refiere al cultivo de plantas completas o casi completas, o al cultivo de órganos, donde se mantiene la estructura característica del órgano o de la planta. Se parece mucho a la propagación vegetativa *in vitro*, por esqueje, división, estolones y yemas o vástagos axilares. Si la estructura orgánica no se destruye, la descendencia obtenida es idéntica al material vegetal original.
- **No organizado:** Si las células y los tejidos se aíslan de una porción organizada de una planta, se desdiferencian y cultivan, se obtiene un crecimiento no organizado (en

forma de callo). Si el callo se disgrega, se originan grupos de células (agregados), y/o células aisladas (cultivo en suspensión).

El crecimiento no organizado, se induce totalmente por el uso de muy altas concentraciones de auxina y/o citocinina en el medio nutritivo. La estabilidad genética de los cultivos no organizados es frecuentemente alta.

- **No organizado/ organizado:** Se trata de un intermedio entre los dos anteriores. Las células de un órgano o tejido aislado primero se desdiferencian, para posteriormente formar tejidos o una capa de tejido calloso. A partir de estos se desarrollan rápidamente órganos (raíces y/o vástagos), o incluso individuos completos (pro-embriones o embriones). Se debe tener en cuenta que las estructuras organizadas se pueden desarrollar a partir de cultivos no organizados espontáneamente o por medio de técnicas especiales. En todos estos casos la descendencia no es completamente idéntica con relación al material original.

## **2.7.2 Regeneración y morfogénesis.**

### **2.7.2.1 Generalidades.**

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

### **2.7.2.2 Tipos de morfogénesis.**

La embriogénesis somática y la organogénesis son dos procesos morfogénicos muy frecuentes en el cultivo *in vitro* de especies vegetales. La embriogénesis somática es el proceso por el cual se obtiene una estructura similar al embrión zigótico sin que medie la fertilización de los gametos. En la organogénesis pueden obtenerse tallos, raíces o flores (Huaranca, 2008).

Estos órganos son inducidos a partir de una célula o de un grupo de células que, según las condiciones del cultivo, tienen la propiedad de mantenerse en activa división (Huaranca, 2008).

#### **2.7.2.2.1 Embriogénesis somática.**

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

- **La embriogénesis directa:** La vía directa, involucra la formación de los embriones somáticos en una parte del tejido del explante sin la formación de callos, ya que las células dentro de un embrión zigótico son de por sí embriogénicas, es posible inducir las para que estas se dividan para formar un embrión somático. En este caso, las células pre-existentes se dividen directamente para formar un embrión somático (Hermosilla, 2011).
- **La embriogénesis indirecta:** La vía indirecta, que requiere una fase intermedia de callo formado por un conjunto de diferentes tipos de células no organizadas y que conservan la capacidad de dividirse. Una vez organizado el callo este prolifera, se inicia la formación de pro-embryones, usualmente en este medio de cultivo con altas concentraciones de auxinas y luego se transfieren los callos a un medio de cultivo con menores concentraciones de reguladores del crecimiento para inducir la formación de los embriones somáticos a partir de los proembryones iniciales (Hermosilla, 2011).

#### **2.7.2.2.2 Organogénesis.**

La organogénesis consiste en la formación de nuevos órganos (raíces y/o brotes adventicios) en los explantes cultivados *in vitro*. Es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de este en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno.

Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía formación de primordios de raíces y el subsecuente enraizamiento final (Ruiz, 1999).

En contraste con la embriogénesis somática, en la vía organogénica para la formación de una planta completa, ya sea por la vía directa o indirecta, se requiere de una secuencia de medios de cultivo, ya que aquellos medios que favorecen el desarrollo de los brotes inhiben la formación de raíces y viceversa (Pérez, 2011).

- **Organogénesis directa:** Es la formación de órganos directamente sobre la superficie de explantes cultivados intactos. El proceso no implica la formación de callo opuesto de organogénesis indirecta.
- **Organogénesis indirecta:** Es la formación de órganos en tejidos de callo derivados de explantes, opuesto de organogénesis directa (Ruiz, 1999).

## **2.8 Requerimientos hormonales.**

### **2.8.1 Los fitoreguladores.**

El fitoregulador es una hormona vegetal. La hormona es una sustancia orgánica que se sintetiza en el interior de la planta y que a bajas concentraciones puede activar, inhibir o modificar su crecimiento. Los efectos producidos por los fitoreguladores tienen que ver principalmente con la estimulación de las raíces, el aumento de la floración, la maduración del fruto y en general con el crecimiento, desarrollo de la planta y todos sus órganos.

No todas las sustancias tienen los mismos efectos sobre los mismos procesos fisiológicos. Las hormonas más utilizadas en agricultura se engloban en los siguientes grupos: auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico, etileno, toliftalam, etefón, daminozida y clormecuat, hidrácida maleica, y sustancias antitranspirantes (Rojas, 2004).

- **Auxinas:** Son sustancias relacionadas con el ácido indolacético (AIA); se caracterizan principalmente por su capacidad para activar el crecimiento. Dentro de las auxinas se encuentran las siguientes sustancias:

Ácido clorofenoxiacético.

Ácido clorofenoxipropiónico.

Ácido naftaleneacético (ANA).

Ácido indolbutírico (AIB).

Ácido indolacético (AIA).

Ácido diclorofenoxiacético (2,4 D).

- **Giberelinas:** Su nombre proviene del hongo *Gibberella fujikuroi* de donde fueron extraídas originalmente. El ácido giberélico (GA3) fue la primera de esta clase de hormonas en ser descubierta, se caracterizan principalmente por su influencia en el alargamiento del tallo y por consiguiente en el mayor crecimiento de las plantas. En general es masculinizante, altera el porcentaje de flores femeninas y masculinas, aumentando estas últimas. Las giberelinas, son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, raíces y semillas en desarrollo (Randal & Hake, 1999) según lo indicó (Gonzales, 1999).

- **Citocininas:** Son sustancias derivadas de la adenina se caracterizan principalmente por su capacidad para intervenir en la división celular. Son muy útiles en el ámbito del cultivo *in vitro*, permitiendo el mantenimiento vivo de tejidos vegetales y estimulando la división de la célula. Dentro de las citocininas se encuentran las siguientes sustancias:

6-bencilaminopurina (6-BAP).

6-furfurilamino purina (Cinetina).

6-dimetilamino purina (2 ip).

6-bencilamino tetrahidroiránil purina (PBA).

6-hidroximetil buterilamino purina (Zeatina).

- **Ácido abscísico (AAB):** Según como lo menciona Gonzales (1999), se caracteriza por inhibir muchos fenómenos del crecimiento vegetal, la fotosíntesis e induce al cierre de los poros de las hojas, por lo que detiene la transpiración. El ácido abscísico (AAB), conocido anteriormente como dormina o abscisina, es un inhibidor del crecimiento natural en plantas (González, 1999).
- **Etileno:** Como lo menciona Gonzales (1999), el etileno es un hidrocarburo, siendo muy diferente a otras hormonas vegetales naturales. Aunque se ha sabido desde principios de siglo que el etileno provoca respuestas tales como geotropismo y abscisión no fue sino hasta el año 1960 que se empezó a aceptar como una hormona vegetal que además influye en la caída de hojas y en la maduración de algunos frutos (Rost, 1982).
- **Etefón:** Actúa sobre la maduración y coloración de los frutos. También se utiliza junto con la giberelina para romper la latencia de algunas semillas.
- **Daminozida y clormecuat:** Son sustancias retardantes o disminuidoras del crecimiento.
- **Hidracida maleica:** Es una sustancia que actúa inhibiendo el crecimiento de la planta y retrasando la brotación de bulbos.
- **Sustancias antitranspirantes:** Estas sustancias disminuyen las elevadas tasas de transpiración y en consecuencia, disminuyen el gasto de agua. En este grupo se encuentra: Di-1-p-menteno, alginatosódico, oxietileno-dodecanol.

## 2.9 Endospermo de coco (agua de coco).

El endospermo líquido de coco se utiliza como un suplemento de un medio de cultivo estándar, corrige deficiencias de molibdeno, manganeso y cobre.

Dentro del campo del cultivo *in vitro*, su uso es de vital importancia para la inducción de la división celular en tejidos diferenciados. En el coco una gran cantidad de endospermo líquido se desarrolla precozmente, y sirve para almacenar nutrimentos para el embrión en desarrollo, mientras el embrión se mantenga latente, el endospermo líquido inducirá la división celular (Caplin y Steward, 1948).

Van Oberbeek en 1940, descubrió que el endospermo lechoso de coco inmaduro era rico en compuestos que promovían citocininas; mientras que Steward en 1950 utilizó la técnica de cultivo celular y aisló muchas citocininas de la leche de coco que incrementaban la división celular en la zanahoria.

En 1955 Shant & Steward encontraron difenilurea mediante la extracción completa con solventes y demostraron que el compuesto cristalino poseía actividad citocinínica.

Según Prevot (1968), en virología, el agua de coco es utilizada para el desarrollo de meristemas vegetativos y florales, cuyo cultivo es la base de un método de cura para plantas infectadas con virus. El agua de coco también sirve como fuente de factores de crecimiento para los cultivos de tejidos destinados al estudio de la biosíntesis de virus vegetales.

### **2.9.1 Composición del agua de coco (AC).**

El agua de coco (AC) es un medio muy complejo, con una amplia gama de componentes orgánicos e inorgánicos; tiene buena capacidad de amortiguación (buffer) y no es raro encontrar sales en ella. Es rica en potasio, magnesio y fosfato, el contenido de azúcar está alrededor del 2%.Adicionalmente se encuentra en ella nitrógeno no proteínico soluble en forma de aminoácidos; pero su uso se justifica no solo por su excelente capacidad amortiguadora sino también por sus cualidades promotoras del crecimiento, en su totalidad son superiores a las de otros medios conocidos. Además, en aquellas áreas, donde crece el coco es significativamente más barato que los compuestos purificados o sintéticos tales como la zeatina o el inositol (García 2010).

### 3. MARCO OPERACIONAL

#### 3.1 Ubicación.

La presente investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos *in vitro* de la Empresa AGROVITROPARIS, en la provincia del Guayas, cantón Guayaquil, parroquia Tarqui, avenida Juan Tanca Marengo Km 4.5, Ecuador.

#### 3.2 Datos Geográficos.

La empresa está localizada al Norte-Este de Guayaquil, a una altitud de 4 m.s.n.m y en un terreno de topografía plana.

#### 3.3 Datos Climáticos.

La temperatura media anual es de 25 °C, tiene una precipitación media anual de 607.86 mm y una humedad relativa anual es de 75 % (INAMHI, 2006).

#### 3.4 Duración.

El inicio del ensayo se realizó desde la tercera semana de Octubre del 2014 y culmino la segunda semana de Febrero del 2015, con una carga horaria de 40 horas a la semana.

#### 3.5 Materiales.

##### 3.5.1 Materiales de laboratorio

Tabla 3: Materiales utilizados en el laboratorio.

Medio WPM	Phyton	Cloruro de mercurio	Hipoclorito de sodio
Cajas Petri.	Agujas.	Papel de aluminio	Phytigel
Hojas de Bisturí.	Mechero	Marcador permanente	Tween 80
Cámara de flujo vertical	Tubos de 50 ml auto-clavables.	Refrigeradora	Frascos de 200ml
Estereoscopio.	Agua destilada estéril.	Papel de kraft	Estantería con lámparas fluorescentes
Microscopio.	Alcohol 80 %.	Tirillas de tornasol	Autoclave.
Micropipeta 2ml	Gradilla.	Agitador magnético	Balanza de precisión

### **3.5.2 Material experimental.**

Para el inicio se utilizaron yemas axilares y apicales de mora tropical cultivar *Brasus* obtenidas en el Centro Gerontológico de Guayaquil.

### **3.5.3 Biorreguladores.**

Los biorreguladores que se utilizaron son: Ácido indolbutírico (AIB) y 6-bencilaminopurina (6-BAP).

### **3.5.4 Sustancias orgánicas.**

Dentro de las sustancias orgánicas se utilizó el endospermo de coco (agua de coco).

### **3.6 Tratamientos en estudio.**

Los tratamientos que se estudiaron fueron los siguientes:

**T1:** WPM +50 ml/l Endospermo de coco.

**T2:** WPM +80 ml/l Endospermo de coco + 1 mg/l de 6-bencilaminopurina (6-BAP).

**T3:** WPM +100 ml/l Endospermo de coco + 2 mg/l de 6-bencilaminopurina (6-BAP)+ 0.25mg/l de ácido indolbutírico (AIB).

**T4:** Control WPM.

### **3.7 Características de los tratamientos.**

➤ Loyd y McCown, Woody Plant Medium (WPM): Medio de cultivo para plantas leñosas.

➤ Endospermo de coco: Suplemento del medio de cultivo estándar. Sustancia químicamente no definida, el endospermo de coco líquido induce la división celular.

➤ (6-BAP): 6-bencilaminopurina, la citocinina interviene en la división celular.

➤ (AIB): Ácido indolbutírico, la auxina activa el crecimiento y enraizamiento de la planta.

### 3.8 Diseño experimental.

Durante el desarrollo del ensayo se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA), con 4 tratamientos, y 10 réplicas.

### 3.9 Análisis de varianza.

A continuación se detalla el esquema del análisis de varianza (ANDEVA) que se utilizó.

Tabla 4: Análisis de varianza.

ANDEVA	
Fuente de Variación	Grados de Libertad
Tratamientos (t – 1)	3
Error Experimental	27
Total (r x t -1)	39

### 3.10 Análisis funcional.

Para realizar las comparaciones de las medias de los tratamientos se utilizó la Diferencia Mínima Significativa (DMS) al 5 % de probabilidad.

### 3.11 Métodos.

- **Esterilización de materiales y equipo.**

Los materiales y equipos utilizados en la siembra de los explantes fueron previamente desinfectados y esterilizados; los instrumentos, cristalería y tubos se lavaron con detergente para luego ser sumergidos en cloro comercial al 1 % y para finalmente introducirlos en una autoclave a una temperatura de 180 °C durante una hora, y así realizar el establecimiento del ensayo.

La cámara de flujo laminar en la que se realizó la propagación *in vitro* del cultivo de mora tropical fue limpiada con alcohol (75 %) y esterilizada con luz ultravioleta durante una hora antes de la siembra de los explantes.

- **Obtención y preparación del material vegetativo.**

El material vegetal que se utilizó para realizar la siembra fueron yemas axilares de 3 a 4 cm de longitud, y sus segmentos seleccionados basándose en las características fenotípicas. El material experimental se extrajo de ramas juveniles y en crecimiento activo a las cuales se les dio un manejo cultural y fitosanitario. Estas muestras fueron obtenidas en el jardín Botánico del Instituto Gerontológico de la M.I. Municipalidad de Guayaquil y de la Facultad de Educación Técnica para el Desarrollo de la UCSG.

- **Preparación del medio basal (WPM).**

Se elaboró el medio del cultivo con las sales minerales de Loyd y McCown, descrita en la (Tabla 5); suplementado con endospermo de coco; 6-bencilaminopurina (6-BAP) y ácido indolbutírico (AIB) reajustando el pH de la solución a 6 detallado en la (Tabla 6).

Con ayuda de pipetas se tomaron cada una de las soluciones madres que fueron usadas en la preparación del medio básico, se diluyeron en vasos de precipitación con agua destilada y desionizada, con la pipeta se agregó el total de agua destilada necesaria para completar la cantidad de medio a preparar.

---

<sup>1</sup> Metodología de la preparación del medio basal. Muñoz F, Reyes H, 2006

Tabla 5. Composición de sales básicas usadas en la preparación del medio de cultivo (WPM).

<b>Formula Química</b>	<b>Nombre</b>	<b>Concentración</b>
<b>Macrosales:</b>		<b>(mg/l)</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Nitrato de amonio	400
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monobásico de potasio	170
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	Cloruro de calcio dihidratado	96
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	Nitrato de calcio	556
<b>Microsales:</b>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido bórico	6,2
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	29,43
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Sulfato de zinc heptahidratado	8,6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	Molibdato de sodio dihidratado	0,25
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	Sulfato de cobre penta hidratado	0,25
<b>Solución de hierro:</b>		
Na <sub>2</sub> EDTA. 2H <sub>2</sub> O	Ácido etilendiaminotetraacéticodisódicodihidrato	37,3
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Sulfato de hierro heptahidratado	27,8
<b>Vitaminas:</b>		
Inositol		100
Ácido nicotínico		1
Clorhidrato de piridoxina		1
Phytigel (g l-1)		2,2
Tiamina-HCl		10

Fuente: Muñoz F: Reyes H, 2006.

Tabla 6: Sustancias utilizadas para elaborar el medio de cultivo WPM modificado en la fase de micropropagación del cultivo in vitro de mora tropical.

Solución	Cantidad	
	mg/l	ml/l
WPM	-	10
Endospermo de coco	-	50;80;100
6-bencilaminopurina (6-BAP)	1;2	
Ácido indolbutirico (AIB)	0,25	

- **Establecimiento de los explantes.**

Luego del lavado en el chorro de agua se cortan los explantes a un tamaño de 1-2 cm de largo, se procedió a sumergirlos y agitarlos durante 15 minutos en una solución de agua destilada y un fungicida-bactericida (Phyton) a una concentración de 1 ml/l de agua. Posteriormente se utilizó agua destilada para el enjuague, inmediatamente se colocaron 2 gotas de mercurio al 2 % y se realizó el enjuague nuevamente con agua destilada. Después que los explantes fueron desinfectados, se los colocó en papel kraff para cortarles los extremos y de esta manera eliminar las puntas blancas de los tejidos por acción directa de los desinfectantes.

Para establecer la siembra se realizó la desinfección de la cámara de flujo laminar, se colocaron en la cámara de siembra todos los instrumentos a utilizar (tubos de ensayos, cajas petri, bisturís y pinzas esterilizados previamente), se encendió la luz ultra violeta por 30 minutos. Se sacaron los tubos de la autoclave, se trasladaron al cuarto de siembra donde se asperjaron con alcohol junto con los explantes de mora.

Posteriormente se realizó la siembra que consistió en las siguientes actividades: flamear las pinzas, bisturí y cajas petri y los tubos de ensayo en el mechero, se sacaron los explantes con pinzas de la caja petri, se eliminaron con el bisturí hojas secas y en parte basal necrótica y se colocaron en los tubos de ensayo que contenían el medio nutritivo, se sellaron los tubos con cinta de parafina e inmediatamente se depositaron en gradillas; se tomaron los registros de identificación y se trasladaron a un cuarto de crecimiento bajo condiciones de 18 °C durante 16 horas de fotoperiodo y 4 000 lux. En este lugar los explantes permanecieron durante 12 semanas consecutivas en condiciones ambientales controladas.

### **3.12 Variables evaluadas.**

#### **3.12.1 Número de brotes por explante.**

Esta variable se registró a los 30, 60 y 90 días después de cada repique.

#### **3.12.2 Longitud de brotes por explante.**

Este dato se registró a los 30, 60 y 90 días después de cada repique, utilizando una regla graduada en cm, desde la base del cuello de la planta hasta el último entrenudo.

#### **3.12.3 Longitud de hojas por explante.**

Este dato se registró a los 30, 60 y 90 días después de cada repique, utilizando una regla graduada en cm midiéndose desde la base del peciolo de la hoja hasta el ápice.

#### **3.12.4 Número de raíces por explante.**

Se evaluó visualmente el número de vitroplantas que presentaron raíces.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Número de brotes.

En la (Tabla 7) se observan los datos concernientes a número de brotes por explante registrados en distintos períodos del cultivo 30, 60 y 90 días. En la evaluación efectuada a los 90 días, los tratamientos T3 (WPM + 100 ml/l endospermo de coco + 2 mg/l 6- bencilaminopurina (6-BAP) + 0.25 mg/l ácido indolbutirico (AIB) y T2 (WPM + 80 ml/l endospermo de coco + 1 mg/l de 6-bencilaminopurina (6-BAP) promovieron el mayor número de brotes. Por el contrario, el tratamiento correspondiente al testigo T4 (WPM) tuvo el menor número de brotes por explante. Las evaluaciones realizadas a los 30 y 60 días arrojaron datos estadísticamente significativos, y a los 90 días se observamos diferencia estadística altamente significativa al 5 % de probabilidad.

Tabla 7. Número de brotes en explantes de mora en varios períodos de evaluación en respuesta a diferentes medios de cultivo a los 30, 60 y 90 días. UCSG, 2015.

Número de brotes			
Tratamientos	30 días	60 días	90 días
T1	1.67	2.00	2.33
T2	2.00	2.44	3.22
T3	2.50	3.10	4.10
T4	1.00	1.13	1.25
Promedio	1.79	2.17	2.73
DMS 0.05 T1 vs T4	*	*	*
DMS 0.05 T2 vs T4	*	*	*
DMS 0.05 T3 vs T4	*	*	*
CV %	19	27.76	25.34

## 4.2. Longitud de brotes.

Los datos correspondientes a longitud de brotes (Tabla 8) registran diferencias significativas entre los tratamientos a los 30, 60 y 90 días, siendo el tratamiento T3 (WPM + 100 ml/l endospermo de coco + 2 mg/l 6-bencilaminopurina (6-BAP) + 0.25 mg/l ácido indolbutírico (AIB) quien tuvo el mayor promedio de longitud de brotes, seguido de T2 (WPM + 80 ml/l endospermo de coco + 1 mg/l de 6-bencilaminopurina (6-BAP). A los 30 días el tratamiento T1 (WPM + 50 ml/l endospermo de coco) tuvo el menor promedio, en cambio a los 60 y 90 días, el tratamiento T4 o testigo convencional (WPM) registró el menor promedio.

Tabla 8. Longitud de brotes en plantas de mora brasus a los 30, 60 y 90 días de después de cada repique. UCSG, 2015.

Tratamientos	Longitud de brotes (cm)		
	30 días	60 días	90 días
T1	4.3	7.5	14.85
T2	9	15.5	31.69
T3	9.87	16.88	33.2
T4	4.5	6.94	12.71
Promedio	6.92	11.71	23.11
DMS 0.05 T1 vs T4	NS	*	*
DMS 0.05 T2 vs T4	*	*	*
DMS 0.05 T3 vs T4	*	*	*
CV %	10.36	10.57	13.03

### 4.3. Longitud de hojas.

Los resultados del análisis de varianza correspondiente a longitud de hojas (Tabla 9) indican que hay significancia estadística entre los tratamientos a los 30, 60 y 90 días del cultivo. El tratamiento T1 (WPM + 50 ml/l endospermo de coco) registró el menor promedio a los 30 días con 3,33 mm; en cambio a los 60 y 90 días el tratamiento T4 (WPM) tuvo el menor promedio con 4,46 mm y 6,78 mm en su debido orden.

Las evaluaciones realizadas muestran que a los 30, 60 y 90 días el tratamiento T3 (WPM + 100 ml/l endospermo de coco + 2 mg/l 6-bencilaminopurina (6-BAP)+ 0.25m/l ácido indolbutirico (AIB) promovió el mayor promedio de longitud de hojas con 7.4; 11.34 y 14.49 mm respectivamente.

Tabla 9. Longitud de hojas en mora tropical a los 30, 60 y 90 días después de cada réplica. UCSG, 2015.

Tratamientos	Longitud de hojas (cm)		
	30 días	60 días	90 días
T1	3.33	5.48	7.48
T2	5.77	8.03	10.92
T3	7.40	11.34	14.49
T4	3.37	4.46	6.78
Promedio	4.97	7.40	9.92
DMS 0.05 T1 vs T4	NS	*	*
DMS 0.05 T2 vs T4	*	*	*
DMS 0.05 T3 vs T4	*	*	*
CV %	19.12	16.32	13.38

#### 4.4 Número de raíces.

En la (Tabla 10) los datos de número de raíces evaluados a los 90 días demostraron que los tratamientos T3(WPM + 100 ml/l endospermo de coco + 2mg/l 6- bencilaminopurina (6-BAP)+ 0.25mg/l ácido indolbutirico (AIB) y T2 (WPM + 80 ml/ l endospermo de coco + 1 mg/l de 6-bencilaminopurina (6-BAP) tuvieron el mayor promedio de número de raíces con 7,9 y 6,11 respectivamente, seguido del T1 ( WPM + 50 ml/l endospermo de coco) con 3,33 y con el menor valor el tratamiento T4 (WPM; testigo convencional) con 1,88 de raíces.

Tabla 10: Número de raíces, en plantas de mora tropical, después de cada replica a los 90 días. UCSG, 2015.

Número de raíces	
Tratamientos	90 días
T1	3.33
T2	6.11
T3	7.9
T4	1.88
Promedio	4.81
DMS 0.05 T1 vs T4	*
DMS 0.05 T2 vs T4	*
DMS 0.05 T3 vs T4	*
CV %	22.37

## 5. DISCUSIÓN

Luego de analizar los resultados obtenidos en este trabajo experimental se determinó que el mayor rendimiento en número de brotes, longitud de brotes y hojas a los 30, 60 y 90 días se observó en el tratamiento T3 (WPM + 100 ml/l endospermo de coco + 2 mg/l 6-bencilaminopurina (6-BAP) + 0.25mg/l ácido indolbutírico (AIB), corroborando lo que señaló Roca y Mroginski (1991), quienes indicaron que, dentro del campo de cultivo *in vitro*, su uso es de vital importancia para la inducción de la división celular en tejidos diferenciados por lo que se justifica no solo por su excelente capacidad amortiguadora sino también por sus cualidades promotoras del crecimiento y que en su totalidad son superiores a las de otros medios conocidos.

Al respecto también Margara (1988), García y Martínez (1994) y Saldivar (1994) manifiestan que en el ámbito de propagación *in vitro* las citocíninas son muy útiles permitiendo el mantenimiento vivo de tejidos vegetales, promueven la división celular, proliferación de yemas axiliares y neoformación de órganos *in vitro*. En este estudio se obtuvieron resultados similares al utilizar 2 mg/l de (6-BAP) en el cultivo *in vitro* de mora tropical con una producción promedio de 4,1 brotes por explante de 33,2 mm y 14,49 mm de longitud de brotes y hojas en su respectivo orden, logrando tener plantas de excelente altura. La hormona 6-bencilaminopurina (6-BAP), es una de las más utilizadas para estimular el crecimiento y desarrollo, división celular, iniciación y crecimiento de raíces (Rojas & Ramírez, 1991).

En lo que respecta al número de raíces registrados a los 90 días, el medio de cultivo compuesto por WPM + 100 ml/l endospermo de coco + 2 mg/l 6-bencilaminopurina (6-BAP)+ 0.25mg/l ácido indolbutírico (AIB); fue el más efectivo; lo cual coincide con lo indicado por (Rojas, 2004), quien manifiesta que “los efectos producidos por los fitoreguladores tienen que ver principalmente con la estimulación de las raíces, el aumento de la floración, la maduración del fruto, y en general con el crecimiento y desarrollo de la planta y todos sus órganos”.

El éxito en la técnica del cultivo *in vitro* o micropropagación en su mayoría depende del medio de cultivo empleado, es vital la definición de los medios de cultivo para cada fase (establecimiento, propagación y enraizamiento) además, este medio de cultivo debe ajustarse a los requerimientos de la especie vegetal ya sea herbácea o leñosa. La efectividad de un medio de cultivo depende tanto de los ingredientes básicos minerales, así como de azúcares y hormonas (Romberger & Tabot, 1971); (Bending, 1974).

Para la fase de enraizamiento por lo general se usan las auxinas, las cuales por su origen pueden ser naturales o sintéticas.

(Castro & Gaviria 1995), realizaron estudios de enraizamiento en diferentes especies del género *Rubus* con la aplicación de ácido indolbutírico (AIB) en diferentes concentraciones, donde se encontró que el AIB a concentraciones entre 1 y 3 mg/l induce un porcentaje de enraizamiento de hasta el 100 %. (Enríquez & Díaz 1994) al incorporar ácido indolacético (AIA) o ácido indolbutírico en el medio de cultivo para la propagación de *Agave angustifolia*, los brotes formaron raíces en mayor cantidad, conforme aumentó la cantidad de la auxina hasta 1 mg/l. Una respuesta similar se obtuvo en esta investigación de tesis, cuando los explantes fueron inducidos en un medio nutritivo de 0,25 mg/l de (AIB) llegando a obtener exitosamente vitroplantas con mayor número de raíces y con un porcentaje del 100 % de plantas enraizadas.

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1 Conclusiones.

- La propagación de la variedad de Mora *brasus* a través del cultivo *in vitro* es viable y segura.
- El medio de cultivo con un suplemento de endospermo de coco, es eficiente en la concentración de los microelementos que contiene.
- Para la propagación *in vitro* de la mora tropical es necesario que ésta se desarrolle en condiciones de temperatura que no superen los 20 °C. Temperaturas mayores a la indicada producen un deterioro en la vitroplantas y un alto grado de fenolización.
- El medio de cultivo a concentraciones de T3: 2 mg/l de 6-bencilaminopurina (6-BAP) indujo los mejores resultados en longitud de brotes, hojas y número de brotes produciendo vitroplantas de mora de alta calidad.
- En el cultivo *in vitro* de mora la mayor producción de raíces por explante se consigue con la utilización de la hormona T3: ácido indolbutírico (AIB) a concentración de 0.25 mg/l.

### 6.2 Recomendaciones.

- Usar agentes antioxidantes (ácido ascórbico y L- cisteína) en los enjuagues y medio de cultivo, para bajar el porcentaje de fenolización en los explantes.
- Utilizar la hormona 6-bencilaminopurina (6-BAP) en concentraciones de 2 mg/l para la multiplicación masiva de mora tropical (*Rubus brasus*) ya que permite obtener un mayor número de brotes y elongación de brotes y hojas.
- Emplear ácido indolbutírico (AIB) a concentraciones de 0,25 mg/l en la fase de enraizamiento del cultivo *in vitro* de mora tropical.
- Implementar nuevos estudios que involucren otras fitohormonas y dosis que tiendan a bajar los costos del proceso.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arbeláez, L. 2008. Micropropagación de *Rubus glaucus Benth* sin agujones en medio sólido y por inmersión temporal. Universidad Tecnológica de Pereira (En línea) el 22 de Noviembre del 2014. Disponible en:  
<http://www.utp.edu.co/investigacion/proyectos/detalleProyectoHTML.php?cod=740>
- Bejarano, W. 1992. Manual de mora *Rubus glaucus Benth*. Proexant. Quito, Ecuador. p.5.
- Bending, H. 1974. Regeneration von haploiden und diploidenpflanzenauspotoplasten von *Petunia hybrida*. L. Z. Pflanzenphysiol. 74: 327-356.
- Buddenford-Joosten, J.M.C y Woltering, E. J. 1994. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development in vitro. *PlantGrowth Reg.* 15.1-16
- Cañal, M.J., Rodríguez, R., Fernández, B., Sánchez-Tamez, R. y Majada, P. J. 1999. Fisiología del cultivo in vitro. 5to. Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. Instituto de biotecnología de las Plantas. Libro de reportes. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.pp.14-22.
- Caplin, S. M y Steward, F. C. 1948. Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. *Science* 108: 655-657.
- Carmona, M.J. 2006. Caracterización Físicoquímica de Seis Materiales de Mora (*Rubus glaucus*) producidas en la ciudad de Manizales. *Agronomía Colombiana*, Vol. 24. pp 306- 316.
- Castro, R. D. y Gaviria, G. B. 1995. Propagación in vitro de especies del género *Rubus* Universidad Católica de Orient. Fundación de Fomento Agropecuario Buen Pastor. Serie: investigaciones-10. Colombia. 9 pp.

- Enríquez, V J R. y Díaz, B. 1994. Experiencias sobre propagación in vitro de plantas. Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca. Serie Cuadernos de los Centros No.1. p. 37.
- García M, Gonzales R, Lazo R, Sánchez Concepción A. 2010. Aloe Vera L. en el cultivo del plátano. Departamento de Biología Universidad de Pinar del Río.
- García, F y Martínez, B. 1994. Introducción a la fisiología vegetal. Ediciones Mundi Prensa. España. 219 p.
- George, E.F. 1993. Plant Propagation by Tissue cultura: The tecnology. Exegetics Limited. Edigton. pp. 283-322.
- Gonzales A María, Raisimi 1999 Hormonas de las plantas consultado en línea 13-02-2014 06:37
- Hartman, H.T. 1984. Propagación de plantas. Principios y Prácticas. CECSA México.
- Hermosilla, F. 2011. Cultivo in vitro en especies del género Pinus. (En línea). Consultado 06 agosto. 2012. Disponible en:  
<http://www.sabetodo.com/contenidos/EpypFIFZupIwUPORRc.php>.
- Huaranca, R. 2008. Morfogénesis in vitro. (En línea). Consultado 06 de Diciembre. 2014. Disponible en:  
<http://www.unapiquitos.edu.pe/intranet/pagsphp/docentes/archivos/Morfogenesis.ppt?PHPSESSID=3b1ff48e55175de2343513968b6cd1bc>.
- Infoagro 2014 El cultivo de la Mora (parte I) consultado en línea 13-02-2015 05:49
- Inamhi 2006 Pronostico del tiempo Guayas consultado en línea 18-02-2015 18:37
- Kosai, T., Fujiwara, M., Hayashi, M. y Aaitken-Christie, J. 1992. The in vitro enviroment and its control in micropropagation. En: Trasplant Production Systems. Kurata, K y Kosai, T. eds. Kluwer Academic Dordrencht. pp. 247-282.

- López, P.C. 1990. Medios de cultivos. En: fundamentos Teóricos- Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Eds. Cadmo H. Rosell y Victor M. Villalobos A. FAO.Roma. pp. 15-19.
- Loyd, G. and B. Mccown. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30:421-427.
- Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro. Mundi – Prensa. Madrid.
- Martínez, A. 2007. Manual del Cultivo de Mora de castilla (*Rubus glaucus*). 1.a Ed. Ambato- Ecuador .pp.7-30
- Monteiro, M. 2004. Cultivo de mora. (En línea). Consultado 23 de Diciembre. 2014. Disponible en: <http://usuarios.netgate.com.uy/cmonteiro/moras.htm>
- Muñoz F, Reyes H, 2006. Efecto de Reguladores de Crecimiento L-CISTEINA y Ácido Ascórbico en el Cultivo In Vitro de Mora de Castilla (*Rubus Glaucus* Beth)
- Montoliu A Vidal 2009, Tesis Doctoral Respuestas Fisiológicas de los cítricos sometidos a condiciones de estrés Biótico y Abiótico. Aspectos Comunes y Específicos
- Natural Medicina, 2014 Mora, composición nutricional y propiedades medicinales, consultado en línea 13-02-2014 05:59
- Oregon Caneberry Comision and Blackberry Comisión 2002. Mora cultivo y manejo postcosecha. (En línea). Consultado 09 de Enero. 2015. Disponible en: [http://www.mag.go.cr/biblioteca\\_virtual\\_ciencia/manual\\_mora\\_02.pdf](http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/manual_mora_02.pdf).
- Pérez, J. 2009. Cultivo in vitro de tejidos vegetales en *Phaseolus* sp. (En línea). Consultado 10 Enero. 2015. Disponible en:

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

Pérez, P. 2011. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. (En línea). Consultado 14 Enero. 2015. Disponible en:

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

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

Prevot, P.L. 1968. L'utilisation du lait de coco comme accelerateur de croissance des vegetaux. *Oleagineux* 23. 177-178

Proyecto Sica. 2006. Producción de la mora a nivel nacional. (En línea). Consultado 19 Enero 2015. Disponible en:

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

Randal, A. y Hakes, S. 1997. Shot meristem formation in vegetative development. *The Plant Cell*.9: 1001-1010.

Reina, C. 1998. Manejo postcosecha y evaluación de la calidad para la mora de Castilla (*Rubus glaucus*) que se comercializa en la ciudad de Neiva. Consultado 24 Enero. 2015. Disponible en:

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

Roca, W y Mroginski, L. 1991. Cultivo de Tejidos en la agricultura. (En Línea). Consultado 28 de Enero.2015. Disponible en:

<http://www.google.com.ec/search?hl=es&biw=1152&bih=705&tbm=bks&q=inautor:%22William+M.+Roca%22&sa=X&psj=1&ei=A4wpULO5OfLM6QH0v4CgAw&ved=0CE8Q9Ag>.

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

Rojas y Ramírez 1991 Control hormonal del desarrollo de las plantas, fisiología-tecnología-experimentación. 2<sup>a</sup>. ed.

Romberger, J. A. y Tabor, C. A. 1971. The Picea abies shoot apical meristem in culture: Agar and autoclaving effects. *Ame. J. Bot.* 58: 131-140.

Rost, T. 1982. Regulation of cell division in pea root tips after wounding: A possible role for ethylene. *Protoplasma* 111:1-9.

Ruiz, J. 1999. Morfogénesis in vitro. (En línea). Consultado 31 Enero. 2015. Disponible en: [http://165.98.8.3/conferencias\\_2Taller/Morfogenesis\\_in\\_vitro.pdf](http://165.98.8.3/conferencias_2Taller/Morfogenesis_in_vitro.pdf).

Saldivar L. H. R. 1994. Fisiología Vegetal. ed. 1. Universidad Autónoma Agraria, Antonio Navarro. Editorial Trillas. México. 23 p.

Salgado-García, R., D. Díaz y J.C. Espinoza. 1997. Las Técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales y su Aplicación Biotecnológica. *Ciencia Nicolaita. V.M.S.N.H.* 14:1-11.

Shantz, E.M., Steward, F. C. J. 1955. *Am. Chem. Soc.* 77 ( 6 ). 351

Van Overbeek, J. 1942. Hormonal control of embryo and seedling growth. *Cold Spring Harbor Symposio on Quantitative Biology* 10: 126-134.

## GLOSARIO

**Andeva:** En inglés ANOVA, se realiza para extraer de los valores medidos la información buscada y necesaria para confirmar o rechazar una hipótesis inicial.

**Auxinas:** Son hormonas vegetales (fitohormonas) de naturaleza cíclica que aparecen en los tejidos meristemáticos, estimulando y coordinando el crecimiento celular por distensión. Facilitan el desarrollo de los embriones, aceleran la curación de las heridas e intervienen en la abscisión de los frutos, la inhibición de las yemas y la determinación de la forma típica de la planta.

**Basal:** Que nace cerca de la base, hace referencia al tallo, hoja, flor.

**Bioteología:** Se refiere a toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos.

**Citoquininas o citocininas:** Su nombre proviene del término «citokinesis» que se refiere al proceso de división celular, el cual podría ser considerado como el segundo proceso madre de todos los procesos fisiológicos en los vegetales, ya que a este proceso le antecede en importancia la diferenciación celular, la cual se encarga de dar origen a la formación de cada uno de los órganos de cualquier vegetal."

**Cultivo *in vitro*:** Significa hacer el cultivo en recipientes de vidrio bajo condiciones asépticas en el laboratorio.

**Endospermo de coco:** La leche de coco es la emulsión diluida de endospermo (almendra de coco) de coco desmenuzado en agua, con una distribución homogénea de los sólidos solubles y en suspensión.

**Explante:** Se refiere a cualquier parte vegetal que ha sido separada de la planta, que puede ser un tejido (fragmentos de hojas, tallos, raíces, pétalos, etc.). Con excepción de los óvulos y el polen, los explantes están constituidos por tejidos y/o células somáticos.

**Fitorregulador:** es un producto regulador del crecimiento de las plantas; normalmente se trata de hormonas vegetales (fitohormonas) y sus principales funciones son estimular o paralizar el desarrollo de las raíces y de las partes aéreas.

**Macroelemento:** Grupo formado por aquellas sustancias que la planta consume en grandes cantidades y que por tanto su carencia resulta evidente mucho antes.

**Medio de cultivo:** Un medio de cultivo consta de un gel o una solución que cuenta con los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, microorganismos, células, tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas.

**Meristemo:** Tejido vegetal o zona de células indiferenciadas que tienen la capacidad de dividirse activamente. A partir del mismo, se forman los otros tejidos que forman el cuerpo vegetal.

**Microelemento:** Sinónimo de Oligoelemento. Elemento nutritivo indispensable para el metabolismo de los seres vivos, aunque lo precisen en muy pequeña cantidad.

**Morfogénesis:** Proviene del griego "morphê" que significa forma y "génesis" creación, literalmente el "origen de la forma" es el proceso biológico que lleva a que un organismo desarrolle su forma. Este es uno de los tres aspectos fundamentales del desarrollo biológico junto con el control del crecimiento celular y la diferenciación celular.

**Ph:** Es una medida de la acidez o basicidad de una disolución.

**Phyton:** Fungicida bactericida líquido, sistémico y de contacto, preventivo y curativo; único en su grupo, con formulación exclusiva y patentada permite que la molécula de cobre sea absorbida y transportada al interior de la planta sin producir fitotoxicidad.

**Repetición:** Reiteración de una observación o medida al mismo nivel de tratamiento. Proporciona una oportunidad para que los efectos de las variables extrañas, incontroladas se compensen y permite, además, medir el error experimental.

**Vitroplantas:** Plantas clonadas en recipientes de laboratorio.

**Yemas apicales:** Son las yemas formadas por la zona vegetativa del tallo y por las hojas modificadas que la protegen. También se conoce como yema terminal.

# **ANEXOS**

Tabla 1 A. Análisis de varianza de número de brotes a los 30 días

Observaciones Repeticiones	Tratamientos				
	T1	T2	T3	T4	
1	1	4	4	1	
2	1	2	2	1	
3	1	2	2	1	
4	1	4	4	1	
5	2	2	3	1	
6	4	1	1	1	
7	-	1	2	1	
8	-	1	1	1	
9	-	1	1	-	
10	-	-	5	-	
S ti	<b>10</b>	<b>18</b>	<b>25.0</b>	<b>8</b>	61
Ri	6	9	10	8	33
X	1.67	2.00	2.50	1.00	1.79

### ANDEVA

F de V	GL	SC	CM	F Cal.	5%	F Tabular	1%
Total	32	3.57					
Trata.	3	1.15	0.38	4.75**	2.93		4.54
Error	29	2.42	0.08				

\*\*= Altamente significativo

<sup>1/</sup> Para realizar el análisis de la varianza, los valores originales fueron transformados a valores de  $\left(\sqrt{x + \frac{1}{2}}\right)$ .

Tabla 2 A. Análisis de varianza de número de brotes a los 60 días

Observaciones Repeticiones	Tratamientos				
	T1	T2	T3	T4	
1	1	5	5	1	
2	1	3	3	1	
3	1	3	3	1	
4	1	5	5	1	
5	3	2	4	2	
6	5	1	1	1	
7	-	1	3	1	
8	-	1	1	1	
9	-	1	1	-	
10	-	-	5	-	
<b>S ti</b>	<b>12</b>	<b>22</b>	<b>31.0</b>	<b>9</b>	74
<b>Ri</b>	6	9	10	8	33
<b>X</b>	2.00	2.44	3.10	1.13	2.17

### ANDEVA

F de V	GL	SC	CM	F Cal.	5%	F Tabular	1%
Total	32	6.79					
Trata.	3	1.40	0.47	2.47 <sub>NS</sub>	2.93		4.54
Error	29	5.39	0.19				

NS= No significativo.

<sup>1/</sup> Para realizar el análisis de la varianza, los valores originales fueron transformados a

valores de  $\left(\sqrt{x + \frac{1}{2}}\right)$ .

Tabla 3 A. Análisis de varianza de número de brotes a los 90 días

Observaciones Repeticiones	Tratamientos				
	T1	T2	T3	T4	
1	1	6	6	1	
2	1	4	4	1	
3	2	4	4	1	
4	1	6	6	1	
5	3	3	5	3	
6	6	1	2	1	
7	-	1	4	1	
8	-	2	2	1	
9	-	2	2	-	
10	-	.	6	-	
<b>S ti</b>	<b>14</b>	<b>29</b>	<b>41.0</b>	<b>10</b>	94
<b>Ri</b>	6	9	10	8	33
<b>X</b>	2.33	3.22	4.10	1.25	2.73

### ANDEVA

F de V	GL	SC	CM	F Cal.	5%	F Tabular	1%
Total	32	8.63					
Trata.	3	3.14	1.05	5.53**	2.93		4.54
Error	29	5.49	0.19				

\*\*= Altamente significativo

<sup>1/</sup> Para realizar el análisis de la varianza, los valores originales fueron transformados a

valores de  $\left(\sqrt{x + \frac{1}{2}}\right)$ .

Tabla 4 A. Análisis de varianza de longitud de brotes a los 30 días

Observaciones Repeticiones	Tratamientos				
	T1	T2	T3	T4	
1	2.8	10	11	4	
2	4	5	13	4	
3	8	12	10	3	
4	3	7	10.5	4	
5	3	15	9.5	7	
6	5	6	7.6	5	
7	-	6	8.5	5	
8	-	12	11.5	4	
9	-	8	7.6	-	
10	-	-	9.5	-	
<b>S ti</b>	<b>25.8</b>	<b>81</b>	<b>98.7</b>	<b>36</b>	241.5
<b>Ri</b>	6	9	10	8	33
<b>X</b>	4.30	9.00	9.87	4.50	6.92

#### ANDEVA

F de V	GL	SC	CM	F Cal.	5%	F Tabular	1%
Total	32	9.18					
Trata.	3	6.96	2.32	30.53**	2.93		4.54
Error	29	2.22	0.076				

\*\*= Altamente significativo

<sup>1/</sup> Para realizar el análisis de la varianza, los valores originales fueron transformados a

valores de  $\left(\sqrt{x + \frac{1}{2}}\right)$ .

Tabla 5 A. Análisis de varianza de longitud de brotes a los 60 días

Observaciones Repeticiones	Tratamientos				
	T1	T2	T3	T4	
1	5.2	17.2	18	6.5	
2	7.5	11.5	20.5	6.5	
3	12.3	18.5	16.5	6	
4	5.4	13.6	18	6.5	
5	5.4	21.2	16,5	9.5	
6	9.2	11.4	14	7	
7	-	11.4	16	7.5	
8	-	18.5	19.2	6	
9	-	16.2	13.6	-	
10	-	-	16.5	-	
<b>S ti</b>	<b>45</b>	<b>139.5</b>	<b>168.8</b>	<b>55.5</b>	408.8
<b>Ri</b>	6	9	10	8	33
<b>X</b>	7.50	15.50	16.88	6.94	11.70

#### ANDEVA

F de V	GL	SC	CM	F Cal.	5%	F Tabular	1%
Total	32	17.96					
Trata.	3	14.24	4.75	36.54**	2.93		4.54
Error	29	3.72	0.13				

\*\*= Altamente significativo

<sup>1/</sup> Para realizar el análisis de la varianza, los valores originales fueron transformados a valores de  $\left(\sqrt{x + \frac{1}{2}}\right)$ .

Tabla 6 A. Análisis de varianza de longitud de brotes a los 90 días

Observaciones Repeticiones	Tratamientos				
	T1	T2	T3	T4	
1	11.2	35.2	35	11.5	
2	13.5	22	40	12.2	
3	24	37	31.5	11.5	
4	11.2	28	35	13	
5	11.2	44	33.5	16	
6	18	22	28	13.5	
7	-	22	32	13	
8	-	42	38	11	
9	-	33	24	-	
10	-	-	35	-	
<b>S ti</b>	<b>89,1</b>	<b>285,2</b>	<b>332,0</b>	<b>101,7</b>	808
<b>Ri</b>	6	9	10	8	33
<b>X</b>	14.85	31.69	33.20	12.71	23.11

**ANDEVA**

F de V	GL	SC	CM	F Cal.	5%	F Tabular	1%
Total	32	42.67					
Trata.	3	31.7	10.57	27.82**	2.93		4.54
Error	39	10.97	0.38				

\*\*= Altamente significativo

<sup>1/</sup> Para realizar el análisis de la varianza, los valores originales fueron transformados a

valores de  $\left(\sqrt{x + \frac{1}{2}}\right)$ .

Tabla 7 A. Análisis de varianza de longitud de hojas a los 30 días

Observaciones Repeticiones	Tratamientos				
	T1	T2	T3	T4	
1	2	7	8	3	
2	3	3	10	3	
3	7	8	7	2	
4	2	4	10	3	
5	2	10	7	6	
6	4	3	5	4	
7	-	3	6	3	
8	-	9	9	3	
9	-	5	5	-	
10	-	-	7	-	
<b>S ti</b>	<b>20</b>	<b>52</b>	<b>74.0</b>	<b>27</b>	173
<b>Ri</b>	6	9	10	8	33
<b>X</b>	3.33	5.78	7.40	3.38	4.97

**ANDEVA**

F de V	GL	SC	CM	F Cal.	5%	F Tabular	1%
Total	32	9.65					
Trata.	3	4.28	1.43	7.53**	2.93		4.54
Error	29	5.37	0.19				

\*\*= Altamente significativo

<sup>1/</sup> Para realizar el análisis de la varianza, los valores originales fueron transformados a

valores de  $\left(\sqrt{x + \frac{1}{2}}\right)$ .

Tabla 8 A. Análisis de varianza de longitud de hojas a los 60 días

Observaciones Repeticiones	Tratamientos				
	T1	T2	T3	T4	
1	3.7	10	11.4	4.1	
2	4.6	5.2	15.3	4.1	
3	11.2	11.4	11.5	3	
4	3.6	6.2	15.4	3.9	
5	11.2	15.2	11.2	7.4	
6	3.6	4.5	8.3	5.2	
7	-	4.5	9.5	4	
8	-	11.3	11.3	4	
9	-	6.4	8.3	-	
10	-	-	11.2	-	
<b>S ti</b>	<b>32.9</b>	<b>74.7</b>	<b>113.4</b>	<b>35.7</b>	256.7
<b>Ri</b>	6	9	10	8	33
<b>X</b>	5.48	8.30	11.34	4.46	7.40

### ANDEVA

F de V	GL	SC	CM	F Cal.	5%	F Tabular	1%
Total	32	13.86					
Trata.	3	8.01	2.67	13.65**	2.93		4.54
Error	29	5.85	0.20				

\*\*= Altamente significativo

<sup>1/</sup> Para realizar el análisis de la varianza, los valores originales fueron transformados a

valores de  $\left(\sqrt{x + \frac{1}{2}}\right)$ .

Tabla 9 A. Análisis de varianza de longitud de hojas a los 90 días

Observaciones Repeticiones	Tratamientos				
	T1	T2	T3	T4	
1	5.3	13	15.4	6.5	
2	7	8.2	18.3	6.9	
3	14.2	14.5	14.5	5.5	
4	5.5	8.2	17.4	6	
5	5.6	17.5	13.2	10	
6	7.2	7.1	11.4	7.1	
7	-	7	13.5	6	
8	-	13.5	15	6.2	
9	-	9.3	12.2	-	
10	-	-	14	-	
<b>S ti</b>	<b>44.9</b>	<b>98.3</b>	<b>144.9</b>	<b>54.2</b>	342.3
<b>Ri</b>	6	9	10	8	33
<b>X</b>	7.48	10.92	14.49	6.78	9.92

### ANDEVA

F de V	GL	SC	CM	F Cal.	5%	F Tabular	1%
Total	32	12.44					
Trata.	3	7.36	2.45	13.61**	2.93		4.54

\*\*= Altamente significativo

<sup>1/</sup> Para realizar el análisis de la varianza, los valores originales fueron transformados a valores de  $\left(\sqrt{x + \frac{1}{2}}\right)$ .

Tabla 10 A. Análisis de varianza de número de raíces a los 90 días.

Observaciones Repeticiones	Tratamientos				
	T1	T2	T3	T4	
1	1	9	12	2	
2	1	8	8	2	
3	2	7	8	2	
4	2	9	9	2	
5	5	6	11	3	
6	9	3	5	2	
7	-	2	8	1	
8	-	5	5	1	
9	-	6	4	-	
10	-	-	9	-	
S ti	<b>20</b>	<b>55</b>	<b>79,0</b>	<b>15</b>	169
Ri	6	9	10	8	33
X	3.33	6.11	7.90	1.88	4.80

### ANDEVA

F de V	GL	SC	CM	F Cal.	5%	F Tabular	1%
Total	32	16,77					
Trata.	3	9.92	3.31	13.79**	2.93		4.54
Error	29	6.85	0.24				

\*\*= Altamente significativo

<sup>1/</sup> Para realizar el análisis de la varianza, los valores originales fueron transformados a valores de  $\left(\sqrt{x + \frac{1}{2}}\right)$ .

Gráfico 1: Área de siembra



Autor: Danny Patricio Ulloa Carrasco, 2015

Gráfico 2: Planta madre de mora Rubus brasus.



Autor: Danny Patricio Ulloa Carrasco, 2015

Gráfico 3: Selección y corte de brotes iniciales en plantas madres.



Autor: Danny Patricio Ulloa Carrasco, 2015

Gráfico 4: Tamaño de brotes ya cortados a nivel de campo



Autor: Danny Patricio Ulloa Carrasco, 2015

Gráfico 5: Transporte de brotes iniciales en horas de la mañana hasta el laboratorio.



Autor: Danny Patricio Ulloa Carrasco, 2015

Gráfico 6: Brotes in vivo para su reducción y desinfección en el laboratorio.



Autor: Danny Patricio Ulloa Carrasco, 2015

Gráfico 7: Explantes ya sumergidos en los desinfectantes para luego ser lavados en asepsia.



Autor: Danny Patricio Ulloa Carrasco, 2015

Gráfico 8: Explantes de mora sembrados en el medio de cultivo inicial.



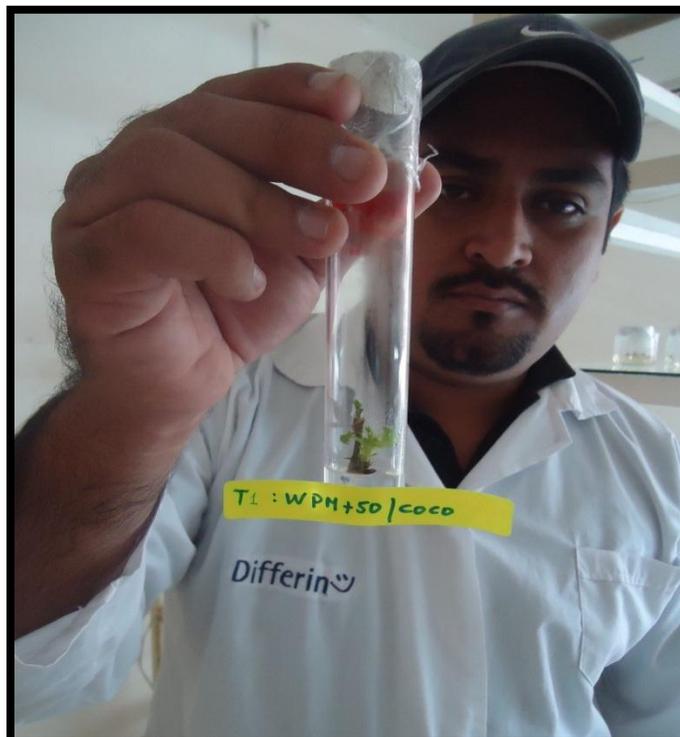
Autor: Danny Patricio Ulloa Carrasco, 2015

Gráfico 9: Explantes listos para ser seleccionados por sanidad (hongos y bacterias).



Autor: Danny Patricio Ulloa Carrasco, 2015

Gráfico 10: Demostración del desarrollo de explantes ya en los tratamientos.



Autor: Danny Patricio Ulloa Carrasco, 2015

Gráfico 11: Desarrollo de explantes de mora en el fitotrón y su ubicación respectiva de los tratamientos.



Autor: Danny Patricio Ulloa Carrasco, 2015

Gráfico 12: Vitroplanta de mora desarrollada caulinarmente y radicularmente.



Autor: Danny Patricio Ulloa Carrasco, 2015