UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Tema: Estandarización del protocolo de micropropagación *in vitro* de frambuesa (*Rubus rosifolius* Sm.) a partir de meristemos axilares

---

Proyecto de Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previa la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autora: Jennifer Verónica Solís Suárez

Tutor: MSc. Wilson Patricio Orozco Freire

Ambato – Ecuador

Octubre – 2019

APROBACIÓN DEL TUTOR

MSc. Wilson Patricio Orozco Freire

Certifica

Que el presente trabajo ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación; el mismo que, responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 17 de Junio de 2019

.....

MSc. Wilson Patricio Orozco Freire

C.I. 172136300-8

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Solís Suárez Jennifer Verónica declaro que los resultados presentes en el Trabajo de Titulación corresponden a la modalidad de Proyectos de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, son auténticos y personales, a excepción de las citas.

……..……

Jennifer Verónica Solís Suárez

C.I. 180435983-2

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

.....

Presidente del tribunal

.....

PhD. Mario Daniel García Solís

C.I. 1103605471

.....

MSc. Walter Aurelio Simbaña Ayo

C.I.170918085

Ambato, 26 de julio de 2019

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y proceso de investigación, según las normas de la investigación.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto de Investigación, con fines de difusión pública, además la reproducción de este proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

…….

Jennifer Verónica Solís Suárez

C.I. 180435983-2

AUTORA

DEDICATORIA

A mis padres: Wilson y Marisol, por siempre estar conmigo en cada uno de los pasos que he dado a lo largo de mi vida, algunos con tropiezos y otros de victoria, incondicionalmente me han apoyado en cada una de las cosas que he querido y estoy infinitamente agradecida por todo, los amo, y este logro es para ustedes papitos.

A mis adorados hermanos: Edwin, muchas gracias por todo lo que me ha brindado y permitido lograr con su apoyo; y Wilson mi pequeño hermanito que ha estado para motivarme con cada una de sus locuras y ocurrencias.

Jennifer Verónica Solís Suárez

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincera gratitud a todas las personas quienes contribuyeron para la ejecución de este proyecto.

A mis padres y hermanos, gracias a ustedes he logrado muchas cosas en mi vida, siempre me han apoyado en cada sueño que he tenido, los amo infinitamente.

A la MSc. Alejandra Rivera y MSc. Paola Rivera por la oportunidad de realizar mi tesis en LePlant, por el apoyo brindado y los conocimientos compartidos.

Al MSc. Patricio Orozco, tutor del proyecto, por el apoyo incondicional, los consejos y las enseñanzas compartidas.

A la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, y a todos sus docentes quienes me brindaron sus valiosos conocimientos.

A las personas con quienes la vida me ha permitido coincidir en este maravilloso camino del aprendizaje: Santy y Jeka, cada locura fue increíble y siempre estarán en mi memoria.

A todas las personas que de una u otra manera supieron guiarme, darme ánimos y fuerza para avanzar a lo largo de este camino.

Jennifer Verónica Solís Suárez

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos 1

1.1.1. Frambuesa (*Rubus rosifoluis* Sm.) 1

1.1.1.1. Generalidades 1

1.1.1.2. Descripción botánica 2

1.1.1.3. Importancia de la especie 3

1.1.1.4. Cultivo *in vitro* 3

1.1.1.5. Medios de cultivo 4

1.1.1.6. Macro y micronutrientes 5

1.1.1.7. Carbohidratos 6

1.1.1.8. Vitaminas 6

1.1.1.9. Reguladores de crecimiento 6

1.1.1.10. Agente gelificante 6

1.1.1.11. Totipotencia celular 7

1.1.1.12. Técnicas de regeneración vegetativa 7

1.1.2. Etapas de cultivo *in vitro* 7

1.1.2.1. Selección del explante 7

1.1.2.2. Desinfección 8

1.1.2.3. Establecimiento *in vitro* 8

1.1.2.4. Multiplicación 9

1.1.2.5. Enraizamiento 9

1.1.2.6. Aclimatación 9

1.1.3. Cultivo por meristemos 10

1.2. Objetivos 10

1.2.1. Objetivo general 10

1.2.2. Objetivos específicos 10

CAPÍTULO II
METODOLOGÍA

2.1. Materiales 12

2.1.1. Ubicación 12

2.1.2. Material vegetal 12

2.1.3. Materiales de laboratorio 13

2.1.4. Equipos 13

2.1.5. Reactivos 14

2.2. Metodología 14

2.2.1. Selección del material vegetal 14

2.2.2. Estudios preliminares con yemas axilares como explante inicial 15

2.2.3. Etapa de desinfección utilizando meristemos como explante 16

2.2.4. Etapa de establecimiento *in vitro* de *Rubus rosifolius* Sm. 17

2.2.5. Etapa de multiplicación *in vitro* de *Rubus rosifolius* Sm. 19

2.2.6. Etapa de enraizamiento *in vitro* de *Rubus rosifolius* Sm. 21

2.2.7. Análisis estadístico 23

2.2.7.1. Interpretación 23

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de resultados 24

3.1.1. Ensayos preliminares 24

3.1.2. Etapa de desinfección de los explantes de *Rubus rosifolius* Sm. 25

3.1.2.1. Porcentaje de contaminación 26

3.1.2.1.1. Contaminación por hongos 27

3.1.2.1.2. Contaminación por bacterias 28

3.1.2.2. Oxidación 29

3.1.2.2.1. Oxidado potencial 29

3.1.2.2.2. Oxidado muerto 30

3.1.2.3. Viabilidad 31

3.1.3. Etapa de establecimiento de los explantes de *Rubus rosifolius* Sm. 32

3.1.3.1. Contaminación 32

3.1.3.2. Oxidación 32

3.1.3.2.1. Oxidado potencial 32

3.1.3.2.2. Oxidado muerto 33

3.1.3.3. Viabilidad 34

3.1.3.4. Hojas y brotes 35

3.1.4. Etapa de multiplicación de los explantes de *Rubus rosifolius* Sm. 36

3.1.4.1. Cantidad de hojas 38

3.1.4.1.1. Cantidad de hojas a los 15 y 30 días 38

3.1.4.2. Cantidad de brotes 40

3.1.4.2.1. Cantidad de brotes a los 15 y 30 días 40

3.1.5. Etapa de enraizamiento de los explantes de *Rubus rosifolius* Sm. 43

3.1.5.1. Cantidad de hojas a los 15 y 30 días 43

3.1.5.2. Cantidad de brotes a los 15 y 30 días 44

CAPÍTULO IV
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

3.2. Verificación de la hipótesis 46

4.1. Conclusiones 47

4.2. Recomendaciones.....48

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 49

ANEXOS 58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos de desinfección aplicados en los explantes de *R. rosifolius* Sm.……...16

Tabla 2. Tratamientos de medios de cultivo para introducción de meristemos……...18

Tabla 3. Tratamiento de medios de cultivo para multiplicación de plántulas……20

Tabla 4. Tratamientos de medios de cultivo para enraizamiento de brotes……...22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación del laboratorio LePlant……...12

Figura 2. Ubicación del huerto "La Frambuesita", vía a Penileo……13

Figura 3. Plantas madre de frambuesa (*Rubus rosifolius* Sm.), en el huerto "La Frambuesita", en Penileo cantón Píllaro, provincia de Tungurahua……...15

Figura 4. A. Oxidación y **B.** Contaminación fúngica en yemas axilares…….24

Figura 5. A. Meristemo oxidado; **B.** Contaminación fúngica y **C.** Meristemo vivo…25

Figura 6. Porcentaje de contaminación, oxidación y viabilidad de cada tratamiento en la etapa de desinfección……...26

Figura 7. Distribución de medias para la variable contaminación por hongos……27

Figura 8. Distribución de medias para la variable contaminación por bacterias……..28

Figura 9. Distribución de medias para la variable oxidados potenciales en la etapa de desinfección……29

Figura 10. Distribución de medias para la variable oxidados muertos en la etapa de desinfección……30

Figura 11. Distribución de medias para la variable viabilidad en la etapa de desinfección……31

Figura 12. Distribución de medias para la variable oxidado potencial en la etapa de establecimiento……...33

Figura 13. Distribución de medias para la variable oxidado muerto en la etapa de establecimiento……...34

Figura 14. Distribución de medias para la variable viabilidad en la etapa de establecimiento……...35

Figura 15. La figura **A** muestra el meristemo 7 días posteriores a su siembra en el medio de cultivo de concentración definida. **B** permite observar el meristemo con brotes pequeños a los 15 días. **C** los brotes presentan mayor longitud a los 30 días y finalmente **D** indica el tamaño final de los brotes en esta etapa que es de 1 cm……36

Figura 16. Evolución de los brotes: **A** día 0 de multiplicación; **B** día 15 de multiplicación; **C** día 30 de multiplicación (5 brotes); **D** día 30 de multiplicación (10 brotes); **E** día 30 de multiplicación (15 brotes)……37

Figura 17. Distribución de medias para la variable cantidad de hojas a los 15 días en la etapa de multiplicación (prueba 1)……...38

Figura 18. Distribución de medias para la variable cantidad de hojas a los 30 días en la etapa de multiplicación (prueba 1)……...39

Figura 19. Distribución de medias para la variable cantidad de hojas a los 15 días en la etapa de multiplicación (prueba 2)……...39

Figura 20. Distribución de medias para la variable cantidad de hojas a los 30 días en la etapa de multiplicación (prueba 2)……...40

Figura 21. Distribución de medias para la variable cantidad de brotes a los 15 días en la etapa de multiplicación (prueba 1)……...41

Figura 22. Distribución de medias para la variable cantidad de brotes a los 30 días en la etapa de multiplicación (prueba 1)……...42

Figura 23. Distribución de medias para la variable cantidad de brotes a los 15 días en la etapa de multiplicación (prueba 2)……...42

Figura 24. Distribución de medias para la variable cantidad de brotes a los 30 días en la etapa de multiplicación (prueba 2)……...43

Figura 25. Distribución de medias para la variable cantidad de hojas a los 15 días en la etapa de enraizamiento……44

Figura 26. Distribución de medias para la variable cantidad de hojas a los 30 días en la etapa de enraizamiento……44

Figura 27. Distribución de medias para la variable cantidad de brotes a los 15 días en la etapa de enraizamiento……45

Figura 28. Distribución de medias para la variable cantidad de brotes a los 30 días en la etapa de enraizamiento……46

Figura29. Plántulas con raíz resultado del tratamiento 5……46

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. Protocolos guías……..59

Anexo 1-A. Protocolo de desinfección de arándano……59

Anexo 2-A. Medio guía para introducción, multiplicación y enraizamiento……...60

Anexo 3-A. Protocolo de preparación de medios de cultivo……61

Anexo 4-A. Formulación medio basal Murashige y Skoog 1962……62

ANEXO B. Resultados de análisis de varianza y prueba de Tukey de cada etapa y variable……63

Anexo 1-B. Análisis de varianza para contaminación por hongos (etapa de desinfección)……...63

Anexo 2-B. Prueba de Tukey para contaminación por hogos (etapa de desinfección).63

Anexo 3-B. Análisis de varianza para contaminación por bacterias (etapa de desinfección)……...63

Anexo 4-B. Análisis de varianza para oxidación potencial (etapa de desinfección)…64

Anexo 5-B. Análisis de varianza para oxidado muerto (etapa de desinfección)……..64

Anexo 6-B. Prueba de Tukey para oxidado muerto (etapa de desinfección)……64

Anexo 7-B. Análisis de varianza para viables (etapa de desinfección)……64

Anexo 8-B. Prueba de Tukey para viables (etapa de desinfección)…….65

Anexo 9-B. Análisis de varianza para oxidación potencial (etapa de introducción)…65

Anexo 10-B. Prueba de Tukey para oxidación potencial (etapa de introducción)……65

Anexo 11-B. Análisis de varianza para oxidado muerto (etapa de introducción)……65

Anexo 12-B. Prueba de Tukey para oxidado muerto (etapa de introducción)……..66

Anexo 13-B. Análisis de varianza para viables (etapa de introducción)……..66

Anexo 14-B. Prueba de Tukey para viables (etapa de introducción)……66

Anexo 15-B. Análisis de varianza para hojas a los 15 días (etapa de multiplicación, prueba 1)……67

Anexo 16-B. Prueba de Tukey para hojas a los 15 días (etapa de multiplicación, prueba 1)……67

Anexo 17-B. Análisis de varianza para brotes a los 15 días (etapa de multiplicación, prueba 1)……67

Anexo 18-B. Prueba de Tukey para brotes a los 15 días (etapa de multiplicación, prueba 1)……68

Anexo 19-B. Análisis de varianza para hojas a los 30 días (etapa de multiplicación, prueba 1)……68

Anexo 20-B. Análisis de varianza para brotes a los 30 días (etapa de multiplicación, prueba 1)……68

Anexo 21-B. Prueba de Tukey para brotes a los 30 días (etapa de multiplicación, prueba 1)……69

Anexo 22-B. Análisis de varianza para hojas a los 15 días (etapa de multiplicación, prueba 2)……69

Anexo 23-B. Análisis de varianza para brotes a los 15 días (etapa de multiplicación, prueba 2)……69

Anexo 24-B. Análisis de varianza para hojas a los 30 días (etapa de multiplicación, prueba 2)……70

Anexo 25-B. Prueba de Tukey para hojas a los 30 días (etapa de multiplicación, prueba 2)……70

Anexo 26-B. Prueba de Tukey para brotes a los 30 días (etapa de multiplicación, prueba 2)……70

Anexo 27-B. Análisis de varianza para hojas a los 15 días (etapa de enraizamiento)……70

Anexo 28-B. Prueba de Tukey para hojas a los 15 días (etapa de enraizamiento)….71

Anexo 29-B. Análisis de varianza para hojas a los 30 días (etapa de enraizamiento)……71

Anexo 30-B. Análisis de varianza para brotes a los 15 días (etapa de enraizamiento).72

Anexo 31-B. Análisis de varianza para hojas a los 30 días (etapa de enraizamiento)...72

Anexo 32-B. Análisis de varianza para brotes a los 30 días (etapa de enraizamiento)72

Anexo 33-B. Prueba de Tukey para brotes a los 30 días (etapa de enraizamiento)…..72

ANEXO C. Imágenes del procedimiento y los resultados de cada tapa del proceso…73

Anexo 1-C. Recepción del material vegetal……73

Anexo 2-C. Corte de hojas y espinas……...73

Anexo 3-C. Colocación de ramas en agua jabonosa y cepillado**……..**73

Anexo 4-C. Lavado de ramas con agua llave……...73

Anexo 5-C. Corte de yemas axilares……...73

Anexo 6-C. Colocación de explantes en frascos estériles……73

Anexo 7-C. Agua jabonosa……74

Anexo 8-C. Fungicida 1mL/100mL……...74

Anexo 9-C. Hipoclorito de sodio 30% ……74

Anexo 10-C. Etanol 70%.....74

Anexo 11-C. Antioxidante……..……74

Anexo 12-C. Trabajo en la cámara de flujo laminar……75

Anexo 13-C. Miniestacas desinfectadas…….75

Anexo 14-C. Miniestaca vista a través del estereoscópio ……...……75

Anexo 15-C. Miniestaca con meristemo…….75

Anexo 16-C. Meristemo visto a través del estereoscópio……75

ABREVIATURAS

m	Metro
cm	Centímetro
mm	Milímetros
g	Gramo
mL	Mililitro
g/L	Gramo por litro
mg/L	Miligramo por litro
mL/L	Mililitro por litro
pH	Potencial Hidrógeno
min	Minutos
h	Horas
BAP	6-Bencilaminopurina
AIB	Ácido indolbutírico
AG_3	Ácido giberélico
DCA	Diseño Completamente Aleatorio
°C	Grados centígrados
psi	Pound square inch (libra por pulgada cuadrada)
MS	Medio basal Murashige & Skoog

RESUMEN EJECUTIVO

La frambuesa (*Rubus rosifolius* Sm.) se ha convertido en una fruta muy apetecible y demandada a nivel nacional debido a los beneficios que aporta tanto en la salud como en la economía de la sociedad. Esta especie ha sido capaz de adaptarse a las condiciones del suelo y clima ecuatoriano, a pesar de no ser nativa. Su propagación en el campo se ha visto afectada por la edad y la pérdida de calidad de la planta madre. Por esta razón es necesario realizar su rejuvenecimiento y micropropagación *in vitro,* lo que permitirá brindar a la comunidad plantas y frutas mejoradas. Para este fin se plantearon diferentes protocolos en cada etapa. En la fase de desinfección se probó dos tratamientos T1 (presencia de antioxidantes) y T2 (ausencia de antioxidantes); introducción T1(6-Bencilaminopurina (BAP), 1mg/L, antioxidantes), T2 (BAP 1.5 mg/L, ausencia de antioxidantes); multiplicación T1 (BAP 1 mg/ L), T2 (BAP 1.5 mg/L) y T3 (BAP 2 mg/L); y enraizamiento T1 (BAP 1 mg/ L; Ácido indolbutírico (AIB)1 mg/L), T2 (BAP 1 mg/ L; AIB 2 mg/L), T3, (BAP 1.5 mg/L; AIB 1 mg/L), T4 (BAP 1.5 mg/L; AIB 2 mg/L), T5 (BAP 2 mg/L; AIB 1 mg/L), T6 (BAP 2 mg/L; AIB 2 mg/L). Se evaluaron diferentes variables y se eligió el tratamiento que presentó mejores resultados para cada una de las etapas: desinfección T1, introducción T1, multiplicación T3, y enraizamiento T5. Los tratamientos elegidos permitieron obtener el protocolo final para la micropropagación de frambuesa.

Palabras clave: desinfección, enraizamiento, establecimiento, frambuesa, meristemos axilares, micropropagación, multiplicación

ABSTRACT

The raspberry (*Rubus rosifolius* Sm.) has become a very appetizing fruit and demanded nationwide due to the benefits it brings both in health and in the economy of society. This species has been able to adapt to the soil conditions and Ecuadorian climate, despite not being native. Its spread in the field has been affected by the age and loss of quality of the mother plant. For this reason it is necessary to perform their rejuvenation and micropropagation in vitro, which will allow the community to provide improved plants and fruits. For this purpose, different protocols were proposed at each stage. In the disinfection phase, two treatments T1 (presence of antioxidants) and T2 (absence of antioxidants) were tested; introduction T1 (6-Benzylaminopurin (BAP), 1mg / L, antioxidants), T2 (BAP 1.5 mg / L, absence of antioxidants); multiplication T1 (BAP 1 mg / L), T2 (BAP 1.5 mg / L) and T3 (BAP 2 mg / L); and rooting T1 (BAP 1 mg / L; Indolbutyric acid (AIB) 1 mg / L), T2 (BAP 1 mg / L; AIB 2 mg / L), T3, (BAP 1.5 mg / L; AIB 1 mg / L), T4 (BAP 1.5 mg / L; AIB 2 mg / L), T5 (BAP 2 mg / L; AIB 1 mg / L), T6 (BAP 2 mg / L; AIB 2 mg / L). Different variables were evaluated and the treatment that presented the best results for each of the stages was chosen: disinfection T1, introduction T1, multiplication T3, and rooting T5. The treatments chosen allowed obtaining the final protocol for raspberry micropropagation.

Keywords: axillary meristems, disinfection, establishment, micropropagation, multiplication, raspberry, rooting,

JUSTIFICACIÓN

Existen varios factores que influyen en la producción alimentaria a nivel mundial. Uno de los más importantes es el calentamiento global. **Piqueras (2007)** afirma que si aumenta la temperatura ambiental es posible que el rendimiento de la producción de los principales cultivos se reduzca en un porcentaje significativo. Además, señala que, si este fenómeno continua, se estima una pérdida entre 1.9 y 22.4% para el año 2080, ya que las precipitaciones decrecerán en un 10% y la humedad del suelo se verá afectada en un 30%.

Por otro lado, otra variable que amenaza la seguridad alimentaria es el crecimiento demográfico. Se estima que para el año 2080, la población aumentará hasta 2100 billones de personas. Esto sugiere la búsqueda de alternativas que permitan mantener o aumentar el rendimiento de producción de los cultivos **(Kashiwase, 2015)**.

La Organización de las Naciones Unidas (ONU) en el Objetivo 2 de Desarrollo Sustentable manifiesta "Poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejor nutrición y promover la agricultura sostenible" **(ONU, 2017)**. En este sentido, estableció el programa "Hambre Cero". El mismo, busca alimentar a los 795 millones de personas que actualmente sufren de hambre. A ello, se suma también los 2000 millones de seres humanos que se calcula estarán en esa situación en el año 2050 **(ONU, 2017)**. No obstante, para cumplir esta meta se requiere concientización y cambios en el sistema agroalimentario mundial, donde cada uno de nosotros también estamos involucrados.

Con el objetivo de incrementar los índices de producción para alimentar a la población de forma sostenible, a nivel mundial se propuso la conocida agricultura intensiva. De acuerdo a **Canomanuel (2015)** la mencionada agricultura, se ha basado en el uso excesivo de agroquímicos. Entre ellos se puede mencionar a los plaguicidas, fungicidas, bactericidas, fertilizantes. **(Canomanuel, 2015)**, etc. Todos generan un daño irreparable a los ecosistemas y sus componentes abióticos y bióticos, como por

ejemplo: humanos, plantas, animales, microorganismos, suelos, sedimentos, atmósfera, hidrósfera **(Sánchez, Ortíz, 2010)**, entre otros.

Por lo antes mencionado, ha sido imprescindible y una responsabilidad de la comunidad científica la búsqueda de nuevas alternativas que permitan generar una mayor cantidad de alimentos para mitigar el hambre y desnutrición de la población mundial en constante crecimiento, superando las condiciones adversas como el cambio climático y claro que causen menos perjuicios a los ecosistemas, evitando el uso excesivo de agroquímicos, además de cuidar la salud de los consumidores.

El Ecuador alberga 17 millones de personas, aunque para el año 2050, se estima que la población llegaría a 23.4 millones de ecuatorianos (**INEC, 2018).** En este contexto, es imprescindible garantizar la alimentación. Según la **Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo (2017)** el Plan Nacional del Buen Vivir, en su objetivo 3: "Mejorar la calidad de vida de la población", tiene como meta, erradicar el hambre de los sectores más pobres y vulnerables. Además, igualmente se ha evidenciado que los agricultores ecuatorianos en su mayoría indígenas, debido al desconocimiento realizan un manejo inadecuado de los agroquímicos, provocando todos los perjuicios anteriormente mencionados **(INEC, 2014)**.

Como alternativa a la agricultura intensiva, y gracias al desarrollo de la biotecnología vegetal, se ha propuesto algunas técnicas para lidiar con estos problemas mencionados. Entre ellas se puede encontrar al cultivo de tejidos vegetales, que es la clonación vegetativa *in vitro* realizada en base a plantas de muy buena calidad **(Daorden & Sanpedro, 1982)**. Las ventajas que ofrece esta técnica, es que se puede propagar miles de plantas en un espacio pequeño en el laboratorio, a diferencia del número de hectáreas requerido para el cultivo en campo. Adicionalmente, al ser realizada en un medio aséptico los clones obtenidos son libres de enfermedades y plagas **(Ahloowalia, 1998)**. También, asegura que los clones serán de excelente calidad. Por lo tanto, usando esta tecnología se podrá aumentar la producción y con el redito de que serán cultivos libres de enfermedades. Igualmente, en campo requerirán la aplicación de menos químicos **(Cruz, 2012).**

Rubus rosifolius Sm., es una de las 23 especies existentes en el Ecuador, distribuida en las provincias de Carchi, Loja, Napo, Pichincha y Santo Domingo de los Tachillas y es nativa de Asia continental e Indonesia y actualmente está naturalizada en nuestro país **(Romoleroux et al., 2018)**. No obstante, *R. rosifolius* fue recientemente introducida con fines alimenticios a la provincia de Tungurahua desde junio de 2010, *R. rosifolius* actualmente crece en la Granja Frambuesita, propiedad de la lugareña Martha Romero, sitio turístico localizada en la comunidad de Penileo, parroquia Presidente Urbina, correspondiente al cantón Píllaro **(Novoa, 2017)**.

Es importante recalcar que la frambuesa es pobremente conocida y consumida, y tan sólo una pequeña parte de la población sabe de sus usos alimenticios **(Novoa, 2017)**. Además, es vital la búsqueda de su constante mejora, por medio de métodos convencionales o biotecnológicos. Así mismo, su importancia radica en sus múltiples beneficios para la salud, como el aportar con compuestos antioxidantes y anticancerígenos **(García & Ara, 2014)**.

Por otro lado, el interés comercial de *Rubus spp.* radica en la demanda existente en el mercado nacional y extranjero. De acuerdo al Banco Central del Ecuador, las exportaciones de la frambuesa se iniciaron en el año de 1996, con bajos volúmenes, hasta el año 2000, en donde logró incrementar sus exportaciones en un 24% **(Mantilla, 2008)**. La producción mundial de *Rubus spp.* es de aproximadamente 412 mil toneladas, sin embargo, el consumo mundial tiene una demanda insatisfecha, originando situaciones de precios elevados en algunos países **(INFOAGRO, 2018).**

Con respecto a la producción de *Rubus spp.*, según datos estadísticos del 2005, Ecuador importa alrededor de 10 toneladas de frambuesa y otras bayas. Hasta el año 2005 se había registrado en el país una superficie cosechada de frambuesa y otras bayas de alrededor de 2250 hectáreas, con una producción a nivel nacional de 3920 toneladas y un rendimiento por hectárea de 1.74 toneladas **(Mantilla, 2008)**.

La importancia de estudiar a *R. rosifolius* también radica en el hecho de que la planta madre de la cual se obtienen las muestras ha logrado multiplicarse en suelos ecuatorianos **(Novoa, 2017)** tales como en Píllaro, y bien podría plantarse en otras

zonas de Tungurahua con fines comerciales. La utilidad de varias especies de plantas del género *Rubus*, no es únicamente del fruto. Según **Estupiñan et al. (2011)** las hojas albergan antocianinas, fenoles, antioxidantes, y otros compuestos químicos usados para tratar síntomas y dolencias. Además, las culturas griegas, romana y china, utilizaban la infusión de las ramas para contrarrestar la diarrea, tratar el cabello seco e inclusive como antídoto para mordedura de serpiente **(Hummer, 2010)**. Por esta razón, es necesario micro propagar esta especie, para poder aprovechar sus frutos y quizás las demás partes vegetativas en distintas partes del país.

El presente proyecto se enfocó en la estandarización de un protocolo de micropropagación de frambuesa *R. rosifolius* a partir de meristemos axilares. Para ello se ajustó las etapas del proceso, desde la recepción de la planta madre, hasta el enraizamiento de las plantas obtenidas.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1. Frambuesa (*Rubus rosifoluis* Sm.)

1.1.1.1. Generalidades

La especie *Rubus rosifolius* es originaria del Himalaya, Asia occidental y Australia, perteneciente a la familia Rosácea, en la cual también se encuentran otras especies particulares de importancia agronómica como la mora, arándano, grosella, frutilla, entre otras **(Oliveira et al. 2016)**. Está formando parte del grupo de plantas que presentan sus frutos en forma de vayas, entendiéndose como tales a aquellos cultivos que producen frutos pequeños y delicados, que requieren cuidadosos procedimientos post-cosecha, intensiva mano de obra y que ocupan generalmente reducidas superficies de cultivo **(Traversaro, 2013)**.

Según **Sánchez y Zúñiga (2017)** está especie de *Rubus rosifolius* es un arbusto leñoso perenne, a diferencia de las frambuesas comunes, *Rubus idaeus,* que son arbustos caducifolios (árboles o arbustos que pierden su follaje durante una parte del año, época desfavorable **(UAEM, 2011)**. Su cultivo se ha extendido alrededor del mundo en la actualidad.

Existen dos tipos generales de frambuesos, las remontantes que tienen dos épocas de producción, cuya primera cosecha se extiende durante determinados meses (aproximadamente 2 cosechas por año), y las no remontantes que fructifican una vez al año **(Ciren, 2017)**.

Para su crecimiento óptimo esta planta necesita permanecer en suelos con un pH de 6.5, sin embargo, está puede ser cultivada tanto en ambientes ligeramente ácidos o

neutros. Es importante para su cultivo mantener los suelos con humedad estable. El exceso de agua en el suelo es perjudicial para la planta, ya que esta se estresa con encharcamientos, por esta razón es importante controlar el drenaje **(Pérez, 2013)**.

La presencia de altas cantidades de materia orgánica es fundamental para que el cultivo sea exitoso, por esta razón es importante aportar al suelo con un abono proveniente del estiércol y paja. La edad media que puede durar un cultivo de frambuesa en el campo es de 10 a 20 años, por esta razón es importante controlar las condiciones del suelo a comenzar el cultivo **(Infrojardín, 2013)**.

En cuanto a sus necesidades lumínicas, es medianamente exigente y puede crecer en lugares expuestos directamente al sol o protegido con una semisombra, indistintamente **(Pérez, 2013).** Con relación al clima, el rango mínimo de temperaturas que puede soportar varía entre -1°C a -7°C. La temperatura alta influye en la fotosíntesis y el crecimiento mientras que la baja influye en la floración **(Intagri, 2010)**.

1.1.1.2. Descripción botánica

El arbusto de la frambuesa de manera independiente alcanza 0.75 m de altura, mientras que cuando se apoya en otra vegetación se extiende lateralmente hasta alcanzar los 2 m o más **(Undurraga, 2013)**.

Tiene varios tallos arqueados, con diámetros de 0.5 a 1 cm y una médula de 3 mm. Además, las ramas tienen espinas cortas, curvas; las plantas adultas tienen un sistema radicular fibroso; las flores tienen cinco pétalos blancos y la fruta es de color rojo brillante y es jugosa cuando madura **(Boufford, 2002)**.

Respecto a sus brotes, **Ciordia (2014)** señala que la cantidad puede oscilar en función de la variedad y edad de la planta, desde 2-3 en el primer año, hasta más de 20 en plantas adultas. En cuanto a sus hojas **Cancino (2011),** menciona que posee hojas alternas trifoliadas o pinnadas, los folios son ovales, alargados, acuminados, aserrados; la hoja presenta un color verde en el haz y color blanquecino con vellosidades en el envés, con vena media.

1.1.1.3. Importancia de la especie

La frambuesa es una fruta de una presencia y aroma exquisitos y con un sabor muy fino y característico. Puede ser utilizada para consumo directo y en las industrias de la alimentación para la elaboración de: mermeladas, jarabes, papillas infantiles, helados, yogurt, licores, etc. Además, actualmente se comercializa en forma de fruta congelada, pulpas y esencias **(Allccaco, 2016)**.

La frambuesa es rica en nutrientes, los cuales cambian en su porcentaje de composición según la variedad. Este fruto está compuesto por agua en un 85-90%, contiene carbohidratos como: fructosa y glucosa, en un 5%; ácido cítrico 1.72%, aproximadamente. También, las frambuesas son una excelente fuente de vitaminas A, C, E y K, además contienen ácido fólico y minerales (fósforo, calcio, magnesio, potasio, manganeso y hierro) **(García & Ara, 2014).**

Adicionalmente, es vital mencionar que tiene un porcentaje alto de antocianinas, principalmente pelargonidinas y cianidinas, que se han relacionado con sus propiedades biológicas y terapéuticas; y a pesar que los estudios sobre contenido fenólico, las actividades de detección de antioxidantes y antimicrobianos son escasos, los resultados obtenidos de varios estudios con la frambuesa y la mora, que pertenecen al género *Rubus*, proporcionan una indicación clara de que poseen estas actividades **(Oliveira et al. 2016).** En el trabajo realizado por **Jonville et al. (2011)** se señala que *Rubus rosifolius*, exhibe actividad analgésica y que puede usarse como fármaco y aplicar para el tratamiento de la malaria, debido a su efecto calmante y antinflamatorio.

1.1.2. Cultivo *in vitro*

El término *in vitro*, "significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial" **(Castillo, 2010)** o en condiciones de laboratorio, en donde de acuerdo a la necesidad de la planta, se suministran las hormonas, vitaminas, nutrientes, sales, etc., que necesita para crecer y desarrollarse. Esta técnica garantiza plantas libres de patógenos y enfermedades.

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento y/o crecimiento de células o tejidos en un medio nutritivo y en condiciones ambientales controladas. Los tejidos vegetales pueden cultivarse *in vitro*, debido a que las plantas poseen zonas con altas cantidades de células madre (meristemos) de característica totipotente, es decir, que cuentan con toda la información genética y capacidad para multiplicarse, diferenciarse y regenerar una planta completa **(Daorden, 2012)**.

La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, utilizando inicialmente un fragmento (explante) de una planta madre, posteriormente se obtiene un grupo uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones **(Castillo, 2010)**.

Según **Cruz (2012)** esta técnica involucra una serie de etapas que inicia en procedimientos de selección y desinfección de la planta madre, posteriormente la introducción de segmentos nodales o meristemos, seguido por la multiplicación y enraizamientos. La última etapa de este proceso se conoce como aclimatación, el cual se realiza fuera de las condiciones de laboratorio, es decir en el campo o invernadero.

La aplicación de la técnica de micropropagación se enfrenta a una serie de limitantes que dificultan la realización de algunas de sus fases o etapas. Entre éstas sobresale el enraizamiento, ya que algunas especies no presentan una respuesta consistente a la aplicación de hormonas que lo estimulan, y la aclimatación del material, la cual involucra aspectos relativos a la anatomía, fisiología y prácticas de manejo del material, que deben conocerse para aplicar procedimientos que permitan aclimatar el material vegetal y lograr su supervivencia **(Cruz, 2012)**.

1.1.2.1. Medios de cultivo

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los organismos en condiciones de laboratorio. La diversidad de nutrientes es tan variada que se ha desarrollado varios medios de cultivo diferentes, entre los que se destacan el formulado

por Murashige y Skoog, utilizados para el cultivo de 1962 o el Woody Plant diseñado para el cultivo de forestales **(Nordeste, 2006)**.

En general, los medios nutritivos para el cultivo de células y tejidos vegetales son menos complejos que los utilizados para cultivos microbianos y son formulados de manera más o menos empírica. Si bien se desarrollan periódicamente nuevas fórmulas comerciales, no existe hasta el presente un diseño racional que tenga en cuenta la composición centesimal de la célula vegetal y el conjunto de condiciones que controlan el crecimiento y la diferenciación **(Llorente, 2002).**

Las células requieren una variedad de nutrimentos orgánicos e inorgánicos, para crecer; estos nutrimentos se requieren en dos niveles: uno macro y otro micro. Generalmente, las células en crecimiento pueden fabricar sus propias proteínas a partir de fuentes adecuadas de nitrógeno y carbohidratos suministradas por el medio de cultivo; sin embargo, existen otras sustancias orgánicas que se requieren en mínimas cantidades **(Roca & Mroginski, 1993)**. Debido a esto, los medios de cultivo por lo general están compuestos de: macronutrientres, micronutrientes, vitaminas, reguladores de crecimiento, un agente gelificante (agar, phytagel, gelatina), carbón activado, antioxidantes, antibióticos, agua, entre otros. El medio de cultivo debe mantener un pH semejante al del suelo que puede variar entre 5 a 8.

1.1.2.2. Macro y micronutrientes

Un organismo necesita una mayor cantidad de macronutrientes que de micronutrientes para funcionar correctamente **(FAO, 2015)**. **Castro (2006)** señala que **l**os nutrientes de mayor importancia que se deben añadir en el medio de cultivo para el correcto desarrollo y óptimo crecimiento del explante son macroelementos como: carbono, potasio, nitrógeno, fósforo, hidrógeno, oxígeno, azufre, magnesio y calcio; y microelelementos como: hierro, zinc, cloro, cobre, molibdeno, boro, manganeso, entre otros.

1.1.2.3. Carbohidratos

Las plantas cuando están sometidas a un sistema *in vitro,* no tienen la capacidad de realizar fotosíntesis por sí solas, comportándose como organismos heterótrofos, por lo cual resulta indispensable añadir azúcares a los medios de cultivo como fuente de carbono para la generación de energía y por ende el mantenimiento de toda la homeostasis. La sacarosa es el azúcar empleado universalmente, aunque también suele emplearse glucosa, maltosa, rafinosa, fructosa o galactosa, entre otros **(Segretín, 2006).**

1.1.2.4. Vitaminas

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones enzimáticas en el metabolismo, estas son requeridas en pequeñas cantidades. Las vitaminas más empleadas son: tiamina (crecimiento radical), ácido nicotínico (producción de raíces y acción inhibitoria en el desarrollo de yemas axilares), piridoxina (coenzima en el metabolismo de los aminoácidos), myo-inositol (tiene un efecto sobre la proliferación de tejidos), ácido ascórbico y ácido cítrico (antioxidantes) **(Segretín, 2006).**

1.1.2.5. Reguladores de crecimiento

Las hormonas reguladoras de crecimientos son los compuestos de mayor importancia en el medio de cultivo. Estas se dividen en auxinas (estimulan el alargamiento celular y promueven la división celular), citoquininas (estimulan la división celular, inducen la formación de brotes, e inhiben la formación de raíces), giberelinas (promueven el crecimiento meristemático, inhiben la formación de callos y raíces adventicias) y retardantes e inhibidores de crecimiento **(Sharry et. al, 2015)**.

1.1.2.6. Agente gelificante

De acuerdo al requerimiento de cada planta, se pueden preparar medios de cultivo sólidos o semisólidos empleando para ello agentes gelificantes.. Los geles ayudan a dar soporte a los tejidos que se encuentran en crecimiento en condiciones estáticas

(Razdan, 2003). Es importante tomar en cuenta la pureza del agar, ya que ocasionalmente aparecen contaminantes de variada naturaleza. La marca y las concentraciones utilizadas pueden causar diferentes respuestas *in vitro* a las esperadas **(Roca & Mroginski, 1993)**.

1.1.2.7. Totipotencia celular

La totipotencia es la capacidad de una célula vegetal de permitir el desarrollo de una planta completa. Las células totipotentes son células somáticas que han conservado su capacidad de dividirse y diferenciarse en células especializadas. De esta forma, si son colocadas en un medio adecuado para su desarrollo, pueden generar todos los órganos de una planta adulta **(Pérez, 2017).**

1.1.2.8. Técnicas de regeneración vegetativa

Para la regeneración de plantas en condiciones *in vitro* existen dos procesos morfogénicos muy utilizados: organogénesis directa (los brotes se forman directamente del explante) o indirecta (existe un paso intermedio a través de la formación de un conjunto de células denominadas callo) y la embriogénesis somática **(Orozco, 2012)**.

1.1.3. Etapas de cultivo *in vitro*

1.1.3.1. Selección del explante

La selección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos **(Roca & Mroginski, 1993)**. Esta fase además, depende de la respuesta que presente en condiciones de laboratorio, así, mientras la planta sea más joven, la respuesta será mejor, porque posee zonas más activas que las que están en una adulta **(Orozco, 2012)**. La planta madre de donde se obtengan los explantes tiene que estar previamente tratada con fungicidas y bactericidas sistémicos, además de haber sido desarrollada en un ambiente ideal de temperatura, humedad, luz. El

objetivo es poder contar con explantes obtenidos de una fuente libre de patógenos y de muy buena calidad.

1.1.3.2. Desinfección

Los procesos de desinfección de las plantas madre que se llevan a cabo en el laboratorio, generalmente constan de lavados del material vegetal con agentes químicos como etanol, hipoclorito de sodio, fungicida, bactericidas, entre otros, a diferentes concentraciones; esto depende de la planta que se utilice, el objetivo de la desinfección es eliminar los microorganismos exógenos **(Jimenez, et.al. 2017).**

Después de haber seleccionado ya la planta madre, se procede a cortar diminutos fragmentos de tejido, los cuales son conocidos como explantes, los cuales pueden ser yemas axilares, porciones de hojas y raíces, semillas, meristemos, etc. Antes de la extracción de estos, se debe realizar una desinfección de las fracciones de planta madre con el fin de eliminar los contaminantes endógenos. Los más comunes son aquellos que se pueden encontrar en el ambiente como hongos y bacterias. Luego de este proceso de desinfección, el material vegetal se debe mantener en condiciones asépticas **(Castillo, 2010)**.

En ciertas ocasiones suele presentarse contaminaciones de tipo endógena que no puede ser eliminada mediante una desinfección de la superficie, en estos casos durante las siguientes etapas del proceso se incluye antibióticos en el medio de cultivo.

1.1.3.3. Establecimiento *in vitro*

El explante ya desinfectado, es colocado en medios de cultivo adecuados con el propósito de inducir una organogénesis directa mediante la inducción de la brotación, la cual depende directamente del equilibrio hormonal. Un nivel alto de auxinas favorece la formación del callo, mientras que la baja concentración de auxinas y alta de citoquininas promueve la brotación **(Quintero, 1996)**.

1.1.3.4. Multiplicación

Esta fase es considerada la más importante e influyente dentro de todo el proceso de cultivo *in vitro*. En esta etapa se tiene la esperanza de que los explantes que fueron capaces de sobrevivir al proceso de desinfección e introducción, puedan originar brotes y hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Estos nuevos retoños se deben dividir y sembrar en un nuevo medio de cultivo (tubos o frascos). Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar para mantener condiciones de asepsia **(Castillo, 2010).**

1.1.3.5. Enraizamiento

El enraizamiento es un tratamiento que se logra sometiendo el tejido a un medio con un balance hormonal diferente. Normalmente, la formación de la raíz se favorece al aumentar la relación auxinas/citoquininas, en algunas especies se obtiene en medios carentes de hormonas, dado el contenido endógeno de las auxinas es suficiente **(Quintero, 1996)**.

Para el enraizamiento se utilizan los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación con una longitud aproximada de 2 cm. Estos se transfieren a medios de cultivo sin reguladores de crecimiento o sólo con auxinas. En ciertos casos las plantas producen raíces en el medio de multiplicación, por lo cual la etapa de enraizamiento ya no es necesaria **(Castillo, 2010)**.

1.1.3.6. Aclimatación

El proceso de aclimatación consiste en transferir las plántulas al ambiente *ex vitro*. Debido a que los brotes se desarrollaron en condiciones de alta humedad y baja intensidad de luz, sus hojas poseen menos ceras epicuticulares que las cultivadas en invernadero. Esto ocasiona que pierdan agua rápidamente al ser trasladada a condiciones *ex vitro*, lo cual pone en riesgo la supervivencia de la plántula. Las plantas necesitan pocos días para que sean capaces de producir su propio recurso de carbono,

pues al ser cultivadas *in vitro*, son suplementadas con sacarosa y se mantienen con poca luz, por lo que no dependen totalmente de su fotosíntesis **(Varela, 2018).**

1.1.4. Cultivo por meristemos

Los meristemos son tejidos que influyen directamente en el crecimiento vegetal, ya que están conformados por células no diferenciadas que se dividen de forma activa (células totipotentes), y tienen la capacidad de dar lugar a todos los tejidos vegetales. Están conformados por células diminutas, presentan forma poliédrica, finas paredes, abundantes vacuolas pequeñas. Permanecen jóvenes y poco diferenciadas, se dividen de manera rápida en los tejidos. Por lo general, los meristemos son utilizados como explante inicial para el cultivo *in vitro* obteniendo así plantas sanas y libres de patógenos **(Zapata, 2012)**.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Estandarizar el protocolo de micropropagación y cultivo *in vitro* de la frambuesa (*Rubus rosifolius* Sm.) a partir de meristemos axilares.

1.2.2. Objetivos específicos

- Realizar estudios preliminares de la fase de desinfección, establecimiento, propagación y enraizamiento del cultivo *in vitro* de meristemos axilares de la frambuesa.
- Identificar el tratamiento adecuado para la desinfección de meristemos axilares de frambuesa.
- Definir el tratamiento óptimo para la introducción de meristemos axilares de la frambuesa.
- Determinar la formulación del medio de cultivo adecuada para la multiplicación de la frambuesa.

- Establecer la formulación ideal del medio de cultivo para el enraizamiento de la frambuesa.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Ubicación

El presente proyecto se desarrolló en las instalaciones del laboratorio LePlant, el cual se dedica al cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, está ubicado en la provincia de Tungurahua, ciudad de Ambato, sector Ficoa ,callas Los Guaytambos y la Delicia, provincia de Tungurahua.

Figura 1. Ubicación del laboratorio LePlant

Fuente: Google Maps

2.1.2. Material vegetal

Se recolectaron ramas de plantas madre de frambuesa, cuya edad aproximada era de 10 años, en el huerto “La Frambuesita”, ubicado en el sector Penileo del cantón Píllaro (1º09`47.6”S 78º33`32.5”W).

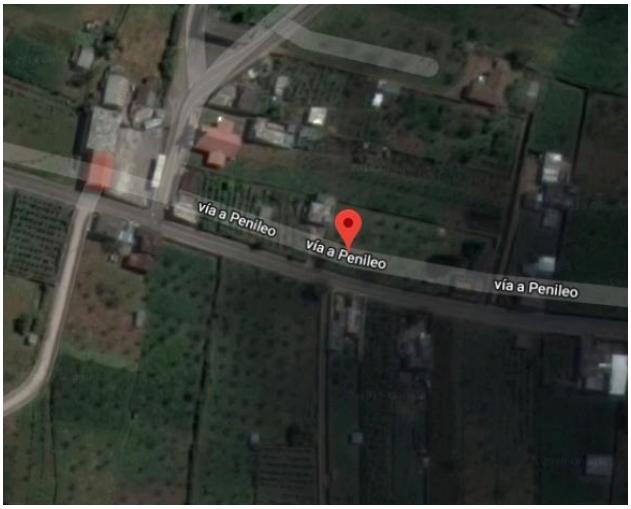


Figura 2. Ubicación del huerto "La Frambuesita", vía a Penileo

Fuente: Google Maps

2.1.3. Materiales de laboratorio

- Materiales de vidrio (tubos de ensayo, matraz Erlenmeyer, probetas, vaso de precipitación, cajas Petri, pipetas, frascos, botellas, vasos pequeños, mecheros, frascos esmerilados)
- Pinzas
- Bisturí
- Porta bisturí

2.1.4. Equipos

- Cámara de flujo laminar (ISOCIDE 5237)
- Autoclave (ALL AMERICAN)
- Balanza analítica (TREE HBR103)
- Estereoscopio (BOECO)
- Plancha de calentamiento
- pH-metro

2.1.5. Reactivos

- Medio Básico Murashige y Skoog (M&S) (Merck)
- Bencilamino purina (BAP) (Merck)
- Ácido giberélico (GA_3) (Merck)
- L-cisteina (Merck)
- Myo-inositol (Merck)
- Ácido nicotínico (Merck)
- Piridoxina (Merck)
- Tiamina (Merck)
- Sacarosa
- Agar (Merck)
- Carbón activado (Merck)
- Ácido clorhídrico (Merck)
- Hidróxido de sodio (Merck)
- Hipoclorito de sodio (Merck)
- Fungicida TRIMIX cobre
- Ácido cítrico (Merck)
- Ácido ascórbico (Merck)
- Etanol
- Ácido indolbutirico (Merck)

2.2. Metodología

2.2.1. Selección del material vegetal

Visualmente se seleccionó las plantas madre de mejor calidad. De los arbustos (Figura 3) se cortaron estacas de entre 25 a 50 cm de longitud, durante la mañana (10h00 am), las cuales fueron envueltas en papel periódico y transportadas al laboratorio LePlant. Una vez en el laboratorio, las muestras fueron inmediatamente tratadas e introducidas con el objetivo de evitar contaminación y oxidación del tejido.

Figura 3. Plantas madre de frambuesa (*Rubus rosifolius* Sm.), en el huerto "La Frambuesita", en Penileo cantón Píllaro, provincia de Tungurahua
Fuente: Solis, V. (2019)

2.2.2. Estudios preliminares con yemas axilares como explante inicial

Se realizaron estudios preliminares con el fin de tener un punto de partida para el ajuste de las variables de estudio de los diseños experimentales de cada protocolo perteneciente a cada etapa del establecimiento del sistema de cultivo *in vitro* de frambuesa. Las estacas recolectadas fueron procesadas para obtener los explantes iniciales que fueron yemas axilares.

Se realizó un pretratamiento previo al proceso de desinfección de los explantes, el cual consistió en cortar las hojas y espinas de las ramas, lavarlas con agua y detergente usando un cepillo de cerdas suaves y un abundante enjuague con agua corriente de grifo. De cada rama se extrajeron segmentos nodales, los cuales a su vez contienen las yemas axilares de 1 cm de longitud aproximadamente, que luego fueron colocados en un frasco de vidrio estéril. A continuación, los explantes se sometieron a diferentes métodos de desinfección superficial, con soluciones de: agua jabonosa, fungicida TRIMIX cobre cuyo principio activo es el fosfito de cobre 240g/L (1mL/100mL), hipoclorito de sodio (30%) y etanol (70%). Después de la exposición a cada solución desinfectante se realizaron dos lavados con agua estéril.

Se probó varios tratamientos de desinfección alterando tiempos y concentraciones de cada agente desinfectante, sin embargo, los porcentajes de contaminación fueron muy altos y la viabilidad fue mínima, por esta razón se decidió experimentar con meristemos axilares.

2.2.3. Etapa de desinfección utilizando meristemos como explante

Se utilizó el mismo pretratamiento detallado en la desinfección para yemas axilares, y a continuación para la desinfección de los explantes se aplicó el protocolo comúnmente utilizado para procesar arándano en el laboratorio LePlant (anexo 1) con unos ajustes que se muestran en la tabla 1. Posteriormente, con la ayuda de un estereoscopio, se extrajeron los meristemos de las yemas axilares en condiciones estériles dentro de una cámara de flujo laminar.

Tabla 1. Tratamientos de desinfección aplicados en los explantes de *R. rosifolius* Sm.

TRATAMIENTO 1		**TRATAMIENTO 2**	
Solución	**Tiempo**	**Solución**	**Tiempo**
Fungicida TRIMIX cobre 5 mL/500 mL	20 min	Fungicida TRIMIX cobre 5 mL/500 mL	20 min
Hipoclorito de sodio 30%	10 min	Hipoclorito de sodio 30%	10 min
Etanol 70%	1 min	Etanol 70%	1 min
Antioxidante (ácido ascórbico + ácido cítrico 100mg/500mL de cada uno)	Hasta la introducción	Sin antioxidante	-

Los resultados en cuanto al porcentaje de viabilidad fueron positivos y por lo tanto se decidió utilizar a los meristemos como explante inicial. Es importante aclarar que, para determinar el efecto del proceso de desinfección tanto en yemas como en meristemos axilares, los explantes fueron sembrados en el medio de cultivo detallado en el anexo 2.

La unidad experimental para la etapa de desinfección fue un tubo con 4 mL de medio de cultivo de composición definida con un respectivo meristemo. Se evaluaron 30 tubos por cada tratamiento.

En esta fase se evaluó cada uno de los tratamientos planteados en la tabla 1. Las variables analizadas fueron: el porcentaje de explantes contaminados con bacterias u hongos, oxidados (potenciales oxidados, muertos) y viables. Se utilizó las siguientes ecuaciones con el fin de identificar los porcentajes correspondientes a cada variable:

$$\%Contaminación = \frac{número\ de\ explantes\ contaminados}{total\ de\ explantes} * 100$$

$$\%Oxidación = \frac{número\ de\ explantes\ oxidados}{total\ de\ explantes} * 100$$

$$\%Viabilidad = \frac{número\ de\ explantes\ vivos}{total\ de\ explantes} * 100$$

Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante un Diseño Completamente Aleatorio (DCA), de esta manera se determinó el mejor tratamiento para la etapa de desinfección de *R. rosifolius* Sm.

2.2.4. Etapa de establecimiento *in vitro* de *Rubus rosifolius* Sm.

Para la etapa de introducción se utilizó como guía el medio reportado por Allccaco (2016) (anexo 3), al cual se le modifico la composición y la concentración, obteniendo así los tratamientos mostrados en la tabla 2.

Tabla 2. Tratamientos de medios de cultivo para introducción de meristemos

Reactivo	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Macronutrientes	10 mL	10 mL
Micronutrientes		
Quelatos		
BAP	1 mL	1,5 mL
Ácido nicotínico	0.5 mL	0.5 mL
Piridoxina		
Tiamina	0.4 mL	0.4 mL
Myo Inositol	0.1 g	0.1 g
Ácido ascórbico	0.1 g	-
Ácido cítrico	0.1 g	-
Azúcar	30 g	30 g
Agar	8 g	8 g
pH	5.8	5.4

El medio preparado de acuerdo al protocolo detallado en el anexo 4 fue dispensando en tubos de ensayo, se agregó 4 mL en cada tubo y posteriormente se esterilizó en la autoclave por 20 minutos a 121°C y 15 psi.

El proceso de siembra se lo realizó en la cámara de flujo laminar. Los meristemos extraídos con ayuda del estereoscopio se sembraron en tubos de ensayo (1 por tubo), en los medios de cultivo indicados en la tabla 2. Una vez sembrado el explante, los tubos fueron sellados con film plástico y colocados en el cuarto de crecimiento. Se incubaron a una temperatura de 20°C, a un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y a una humedad de 36%. La evaluación de los tubos se realizó cada 15 días durante 45 días.

En la etapa de establecimiento se evaluó el efecto de la variación de concentración de BAP, la presencia y ausencia de antioxidantes y el pH, manteniendo constante la concentración de los demás reactivos presentes en la tabla 2.

La unidad experimental en esta fase fue un tubo con 4 mL de medio de cultivo de composición definida (de acuerdo al tratamiento aplicado) y con un meristemo. Se destinó 30 tubos para cada tratamiento.

Para verificar el efecto de los medios en esta etapa las variables medidas fueron oxidación y viabilidad de los explantes. Para la evaluación del porcentaje de oxidación se estableció la siguiente escala como referencia:

1. **Oxidado potencial:** nivel bajo de necrosis, explante viable
2. **Oxidado muerto:** necrosado totalmente

Los datos se evaluaron utilizando un (DCA), además se realizó una prueba de Tukey; de esta manera se determinó cuál es el tratamiento idóneo para la etapa de introducción de *R. rosifolius* Sm.

2.2.5. Etapa de multiplicación *in vitro* de *Rubus rosifolius* Sm.

En esta etapa, se utilizó el mismo medio de introducción reportado por Allccaco (2016) (anexo 3), y se realizaron modificaciones en cuanto a la composición y concentración, obteniendo así los tratamientos mostrados en la tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos de medios de cultivo para multiplicación de plántulas

Reactivo	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
Macronutrientes	10 mL	10 mL	10 mL
Micronutrientes			
Quelatos			
BAP	1 mL	1,5 mL	2 mL
Ácido nicotínico	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
Piridoxina			
Tiamina	0.4 mL	0.4 mL	0.4 mL
Myo Inositol	0.1 g	0.1 g	0.1 g
L-cisteína	0.1 g	0.1 g	0.1 g
Ácido giberélico	0.08 mL	0.08 mL	0.08 mL
Azúcar	30 g	30 g	30 g
Agar	8 g	8 g	8 g
pH	5.8	5.8	5.8

El medio de cultivo preparado de acuerdo al protocolo detallado en el anexo 4, se agregó 30 mL en cada frasco y posteriormente se esterilizó en la autoclave por 20 minutos a 121°C y 15 psi.

En la cámara de flujo laminar, una vez sembrados los nuevos brotes en frascos con medio, estos fueron sellados con film plástico y colocados en el cuarto de crecimiento. Se incubaron a una temperatura de 20°C, a un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y a una humedad de 36%. La evaluación de los frascos se realizó cada 7 días durante 30 días.

En la etapa de multiplicación se valoró el efecto de la variación en la concentración de BAP, conservando igual la cantidad de los demás reactivos presentes en la tabla 3. Las variables de estudio fueron el número de hojas y brotes.

Para el periodo de multiplicación, la unidad experimental fue un brote obtenido del establecimiento, el cual fue sembrado en un frasco con 30 mL de medio de composición definida (5 unidades experimentales por frasco).

Los datos fueron analizados utilizando (DCA) y una prueba de Tukey; para elegir el mejor tratamiento en esta etapa de la micropropagación de *R. rosifolius* Sm.

2.2.6. Etapa de enraizamiento *in vitro* de *Rubus rosifolius* Sm.

En esta etapa se utilizó como guía el medio de introducción de Allccaco (2016) (ver anexo 3), con algunas modificaciones como se muestran en la tabla 4. Se utilizaron concentraciones variadas de BAP y AIB, con el fin de observar el mejor tratamiento y se añadió carbón activado con el fin de simular el color del suelo, para que las raíces puedan crecer.

Tabla 4. Tratamientos de medios de cultivo para enraizamiento de brotes

Reactivo	Trat. 1	Trat. 2	Trat. 3	Trat. 4	Trat. 5	Trat. 6
Macronutrientes	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
Micronutrientes						
Quelatos						
BAP	1 mL	1 mL	1,5 mL	1,5 mL	2 mL	2 mL
AIB	1 mL	2 mL	1 mL	2 mL	1 mL	2 mL
Ácido giberélico	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Ácido nicotínico	0.5	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
Piridoxina						
Tiamina	0.4 mL	0.4 mL	0.4 mL	0.4 mL	0.4 mL	0.4 mL
Myo Inositol	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g
L-cisteína	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g
Carbón activado	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g
Azúcar	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g
Agar	8 g	8 g	8 g	8 g	8 g	8 g
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

El medio de cultivo preparado de acuerdo al protocolo detallado en el anexo 4, se agregó 30 mL en cada frasco y posteriormente se esterilizó en la autoclave por 20 minutos a 121°C y 15 psi.

En la cámara de flujo laminar los brotes fueron sembrados en frascos que se sellaron después con film plástico y colocados en el cuarto de crecimiento. Se incubaron a una temperatura de 20°C, a un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y a una humedad de 36%. La evaluación de los frascos se realizó cada 15 días durante 45 días.

En la etapa de enraizamiento se analizó el resultado de la variación de la concentración de BAP y AIB, conservando la cantidad de los demás reactivos presentes en la tabla 4. Sus variables evaluadas fueron cantidad de hojas, brotes y presencia de raíces.

En el caso del enraizamiento, la unidad experimental fue un brote desarrollado (clon) obtenido de la multiplicación, el cual fue sembrado en un frasco con 30 mL de medio de composición definida (3 unidades experimentales por frasco).

Los datos se evaluaron utilizando un (DCA), además se realizó una prueba de Tukey; de esta manera se determinó el tratamiento óptimo para la fase de enraizamiento de *R. rosifolius* Sm.

2.2.7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en cada una de las etapas se procesaron en el programa estadístico Statgraphics 18, y se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey si se requería.

2.2.7.1. Interpretación

Con el diseño experimental utilizado en el protocolo de establecimiento *in vitro* de *Rubus rosifolius* Sm., se logró identificar un método ideal de desinfección e introducción, además de los medios idóneos para que la planta se multiplique y enraíce.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.Análisis y discusión de resultados

3.1.1. Ensayos preliminares

En los ensayos preliminares analizados para la etapa de desinfección, utilizando segmentos nodales, se pudo observar que los explantes presentaron un gran porcentaje de contaminación con hongos y oxidación (figura 4), resultando en la pérdida de gran cantidad de material vegetal.

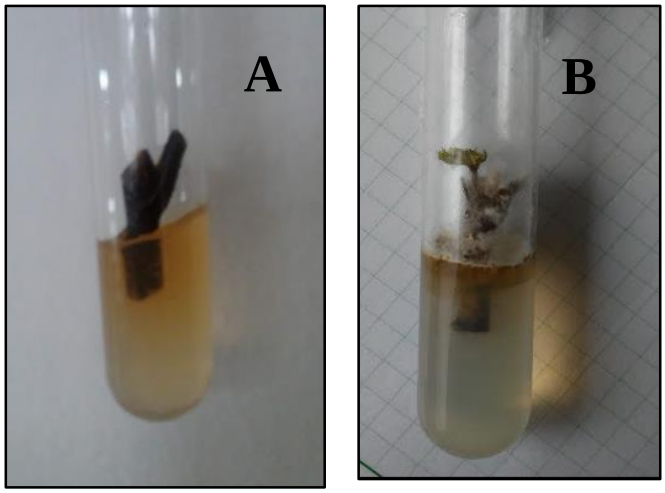


Figura 4. A. Oxidación y **B.** Contaminación fúngica en yemas axilares
Fuente: Solis, V. (2019)

Como alternativa, se procedió a la desinfección de meristemos. Este proceso fue similar al que se utilizó con yemas, sin embargo, en las concentraciones probadas inicialmente, algunos tratamientos fueron demasiado fuertes y oxidaron por completo al meristemo, mientras que otros fueron débiles y se evidenció contaminación fúngica (figura 5). Luego de probar varias concentraciones, se halló la ideal, con la cual se redujo significativamente la cantidad de explantes oxidados y contaminados.

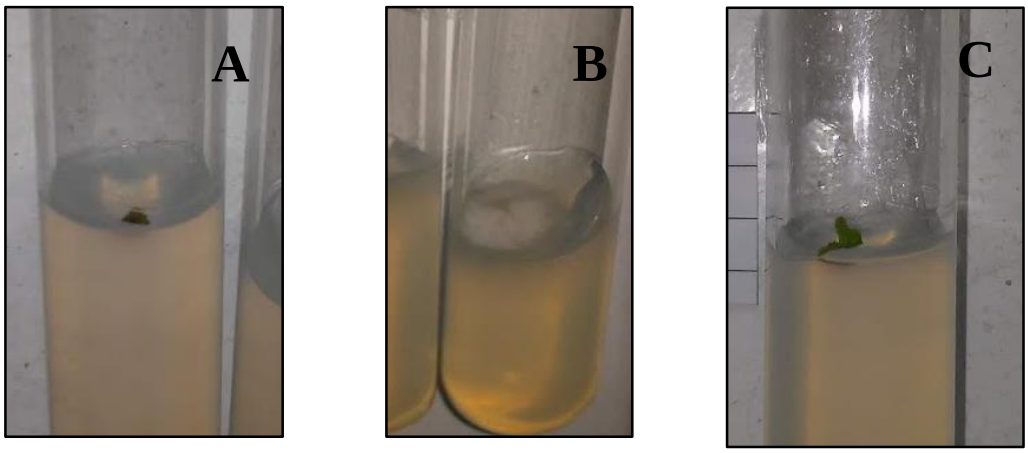


Figura 5. **A** Meristemo oxidado; **B** Contaminación fúngica y **C** Meristemo vivo

Fuente: Solis, V. (2019)

La contaminación fúngica presente en los meristemos, pudo deberse a la incorrecta manipulación de los mismos o a los instrumentos contaminados. **Molina y Melgar (2014)** afirman que el meristemo está libre de patógenos debido a su elevada actividad metabólica, con lo cual es más difícil para los patógenos invadir células, razón por la cual al finalizar los ensayos preliminares se decidió continuar con el proceso de cultivo *in vitro* mediante el uso de meristemos como explante.

3.1.2. Etapa de desinfección de los explantes de *Rubus rosifolius* Sm.

La contaminación microbiana es uno de los problemas principales que afectan en la micropropagación de especies vegetales, esta puede ser producida por microorganismos endófitos o introducidos durante la manipulación de laboratorio **(Gonzales, 2017)**. Por esta razón, es importante aplicar un proceso de desinfección previo a la introducción de los explantes en un ambiente estéril y con condiciones controladas. En esta etapa se plantearon dos tratamientos, los cuales están detallados en la tabla 1.

En la figura 6 se observan los porcentajes para cada una de las variables analizadas en los tratamientos utilizados.

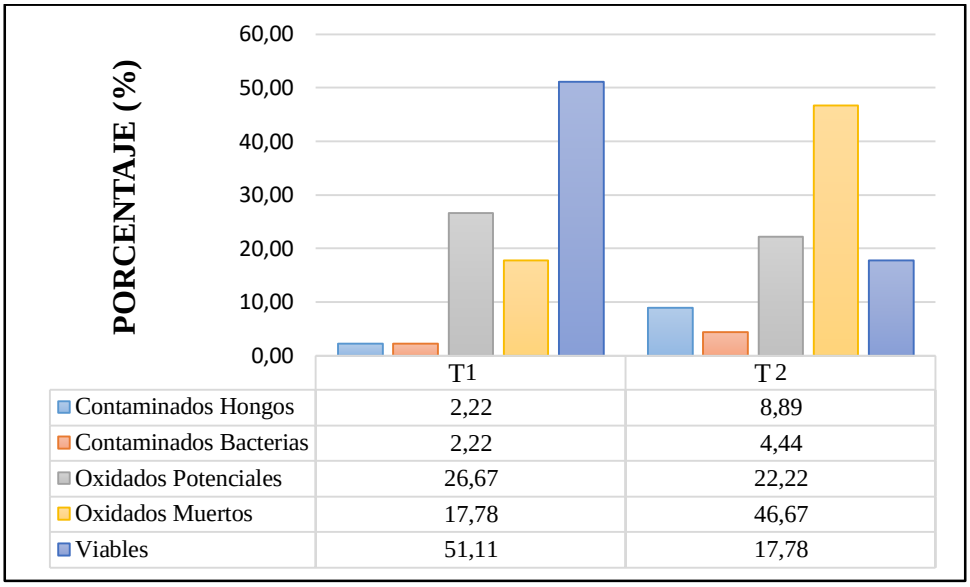


Figura 6. Porcentaje de contaminación, oxidación y viabilidad de cada tratamiento en la etapa de desinfección.

Como se puede observar en la figura 6 el tratamiento 2 presenta mayor cantidad de explantes contaminados tanto con bacterias y hongos, además de mayor oxidación. Mientras que el tratamiento 1 presenta mayor cantidad de explantes viables.

3.1.2.1. Porcentaje de contaminación

La revista **CENIC (2000)** menciona que debido a la contaminación por microorganismos (hongos y bacterias) en la micropropagación de tejidos *in vitro*, las pérdidas de los cultivos son numerosas lo que ocasiona que muchos procesos sean económicamente ineficientes. El principal efecto negativo que los microorganismos contaminantes provocan es que compiten con las plantas por los nutrientes del medio de cultivo, y les provocan daños directos o indirectos por la presencia de los mismos en sus tejidos, dando como resultado la producción de metabolitos tóxicos, lo que puede provocar disminución en la tasa de multiplicación, ausencia de raíces e incluso la muerte.

Con el fin de evitar la presencia de agentes contaminantes se procedió a aplicar un proceso de desinfección, el cual consistió en una serie de soluciones con

concentraciones y tiempos determinados; las soluciones utilizadas fueron agua jabonosa para quitar la mayor parte de tierra presente en la planta madre, fungicida TRIMIX cobre 5mL / 500mL con el fin de inhibir o eliminar hongos **(McGrath, 2004)**, hipoclorito de sodio 30% y etanol 70% y antioxidantes (tabla 1).

La variable contaminación se dividió en dos categorías: la contaminación producida por hongos y la contaminación producida por bacterias.

3.1.2.1.1. Contaminación por hongos

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza (ANOVA) de los tratamientos en la etapa de desinfección (Anexo 1-B), demostraron la existencia de una diferencia significativa entre ellos ($p<0.05$), además la prueba de Tukey aplicada (Anexo 2-B), mostró que existe una diferencia significativa entre T1 y T2.

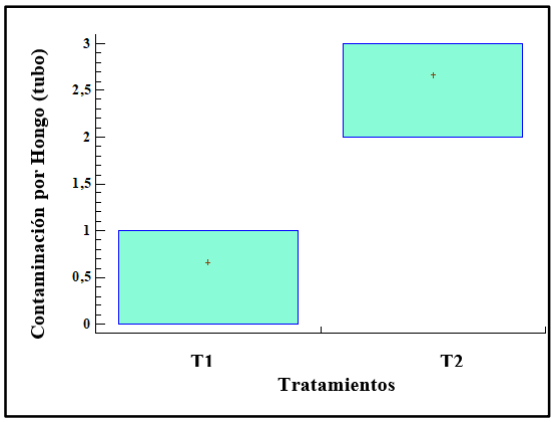


Figura 7. Distribución de medias para la variable contaminación por hongos

La figura 7 muestra que T1 presenta menor cantidad de muestras contaminadas con hongos.

Es probable que la contaminación por hongo se deba a la incorrecta manipulación de los explantes al momento de realizar la desinfección. **Sánchez y Salaverría (2004)** mencionan que la elevada presencia de polvo en los tejidos y el contacto directo de estos con el suelo provocan una contaminación de los explantes tomados del campo.

3.1.2.1.2. Contaminación por bacterias

El análisis de varianza de los tratamientos en la etapa de desinfección (Anexo 3-B), señaló que no existe una diferencia significativa ($p \geq 0.05$) entre los tratamientos para la variable contaminación por bacteria.

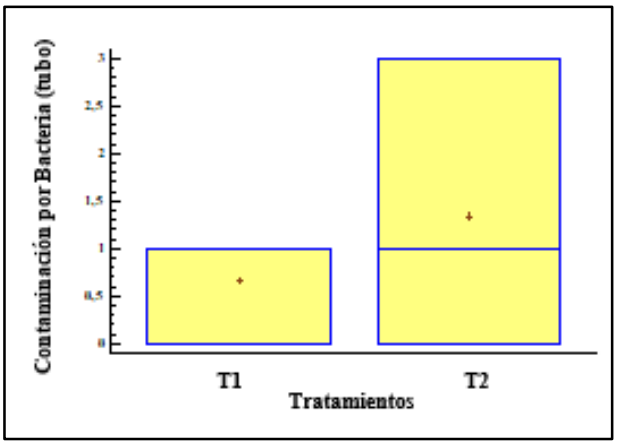


Figura 8. Distribución de medias para la variable contaminación por bacterias

Como se puede observar en la figura 8, hay mayor cantidad de muestras contaminadas en el T2.

La presencia de bacterias endógenas en el medio de cultivo puede deberse a la manipulación de las herramientas utilizadas en la etapa de establecimiento, y a la ausencia de bactericidas en las fases del proceso de desinfección de los explantes. **Alvarado et. al (2003),** sugiere que otro de los factores que influye en la proliferación bacteriana es el pH del medio de cultivo.

En los ensayos preliminares realizados con estacas, se descubrió que la exposición a concentraciones altas y tiempo prolongado de los agentes desinfectantes utilizados, causó la muerte del explante por oxidación, mientras que concentraciones débiles o tiempos cortos, produjeron la contaminación excesiva con hongos y bacterias, se llegó a un equilibrio entre tiempo y concentración (tabla 1) que permitió obtener explantes vivos.

3.1.2.2. Oxidación

El oscurecimiento que presentaron los tejidos cultivados de manera *in vitro*, se define como oxidación, la razón de que ésta se produzca es debido a radicales libres, compuestos fenólicos oxidados por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir especies químicas como quinonas, capaces de causar daño e incluso la muerte celular **(Azofeifa, 2009)**.

3.1.2.2.1. Oxidado potencial

Los meristemos que presentaron esta variable, en su mayoría produjeron brotes viables, al dejarlos más tiempo en el cuarto de crecimiento, expuestos al fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Los resultados del ANOVA para la variable oxidado potencial en la etapa de desinfección concluyeron que no existe una diferencia significativa ($p \geq 0.05$) entre los dos tratamientos utilizados (Anexo 4-B).

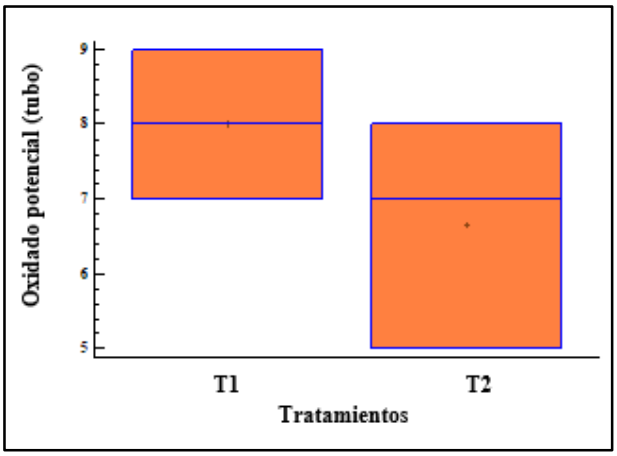


Figura 9. Distribución de medias para la variable explantes oxidados potenciales en la etapa de desinfección

El tejido vegetal sufre lesiones durante el proceso de desinfección ya que los agentes desinfectantes tienen efectos abrasivos sobre las células **(Sánchez y Salaverría, 2004).** Por esta razón es importante controlar la concentración y el tiempo de

exposición de los explantes, para evitar que las lesiones en los tejidos sean severas. La exposición de los explantes a la solución con agentes antioxidantes hasta su siembra, permitió que la oxidación reduzca en gran porcentaje.

3.1.2.2.2. Oxidado muerto

Los meristemos oxidados fueron desechados luego de su evaluación, ya que, al presentar necrosis total en su tejido, no dieron paso a la formación de un nuevo brote. **Azofeifa (2009),** menciona que la oxidación está relacionada con el estrés que sufren las células y provoca la estimulación del metabolismo de los compuestos fenólicos.

De acuerdo a los resultados arrojados en ANOVA para la variable oxidado muerto se observa que presenta diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos (Anexo 5-B), se realizó una prueba de Tukey la cual indicó que T1 y T2 son significativamente diferentes (Anexo 6-B).

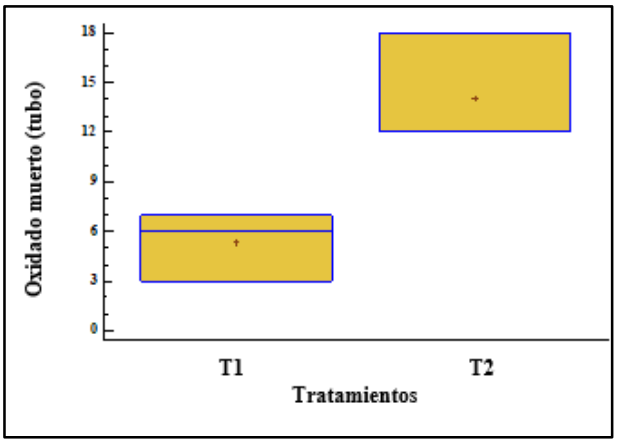


Figura 10. Distribución de medias para la variable oxidados muertos en la etapa de desinfección

La figura 10 muestra que la mayor cantidad de explantes muertos por oxidación se presentaron en T2, en el cual no se emplearon antioxidantes para proteger a los explantes. Estos resultados sugieren que el empleo de ácido ascórbico y ácido cítrico a una concentración de 100 mg/ 500mL de cada uno son suficientes para evitar la muerte del explante.

3.1.2.3. Viabilidad

Esta es la variable de mayor interés dentro de la etapa de desinfección, ya que los meristemos que la presenten serán capaces de producir brotes nuevos, útiles en las siguientes etapas de micropropagación de la planta.

En el ANOVA realizado se obtuvo que existe diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos analizados para la variable viabilidad (Anexo 7-B), con la prueba de Tukey se determinó que los tratamientos T1 y T2 difieren significativamente (Anexo 8-B).

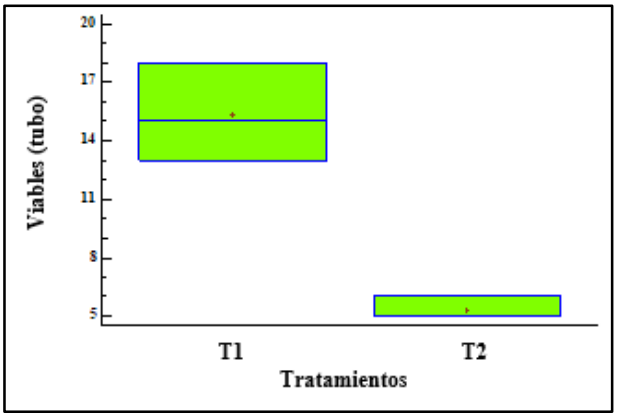


Figura 11. Distribución de medias para la variable viabilidad en la etapa de desinfección

Como se observa en la figura 11, el tratamiento que presenta un mayor número de meristemos vivos, en comparación con T2. De igual manera que se mencionó en la etapa de desinfección, un equilibrio entre el tiempo y la concentración de los agentes desinfectantes, es de suma importancia para evitar oxidaciones y de igual manera la presencia de microorganismos.

3.1.3. Etapa de establecimiento de los explantes de *Rubus rosifolius* Sm.

Luego de haber determinado que el tratamiento 1 fue el más eficaz en la etapa de desinfección debido a que presentó menor contaminación y oxidación, y máxima viabilidad, se procedió a evaluar diferentes medios de cultivo en la etapa de introducción. Para esta fase se mantuvo el protocolo de desinfección ya establecido, de todas maneras, se conservó el análisis de la oxidación, contaminación y viabilidad.

3.1.3.1. Contaminación

En esta fase no se presentó contaminación ya que los medios de cultivo utilizados fueron previamente esterilizados antes de usarlos, lo cual aseguró que se encontraban libres de microorganismos, y por lo tanto no son fuente de contaminación de bacterias y hongos.

3.1.3.2. Oxidación

Los meristemos están expuestos a estrés oxidativo al momento de ser manipulados. **Viada (2017)** menciona que el estrés oxidativo en células y tejidos aparece cuando existe una perturbación del equilibrio de las sustancias. Este fenómeno se presenta con la reducción del potencial celular.

Los tratamientos utilizados en esta etapa se diferenciaron en la presencia o ausencia de antioxidantes. T1 tuvo en la composición de su medio la presencia de ácido cítrico y ácido ascórbico. Lo que se quiso probar en esta etapa fue el efecto de antioxidantes en el medio de cultivo.

3.1.3.2.1. Oxidado potencial

Los resultados ANOVA para la variable oxidación potencial en la etapa de introducción señalaron la existencia de una diferencia significativa ($p<0.05$) entre tratamientos (Anexo 9-B), y la prueba Tukey realizada mostró que T1 y T2 no son iguales (Anexo 10-B).

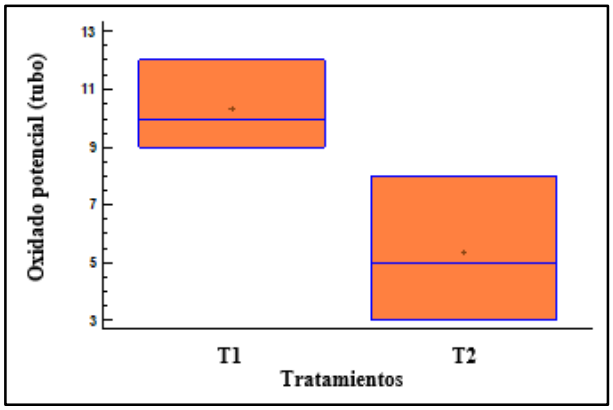


Figura 12. Distribución de medias para la variable oxidado potencial en la etapa de establecimiento

La mayor cantidad de oxidados potenciales, como se muestra en la figura 12, se encontraron en el T1, con una media de 10; los resultados muestran que la presencia de oxidación potencial no afecta la viabilidad de los explantes.

El tratamiento 1 contenía en su composición la presencia (tabla 2) de antioxidantes y los explantes luego de pasar por el proceso de desinfección, en el cual están sometidos a estrés, necesitan tener agentes que los protejan en el medio de cultivo. Según **Shary, et. al (2015),** una de las estrategias para eludir el proceso de oxidación es el uso de antioxidantes y también disminuir la duración de la esterilización del explante o cambiar el agente desinfectante.

3.1.3.2.2. Oxidado muerto

Con respecto a la variable oxidado muerto en esta etapa, el ANOVA mostró una diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos (Anexo 11-B), la prueba de Tukey por su parte muestra una significativa diferencia entre T1 y T2 (Anexo 12-B).

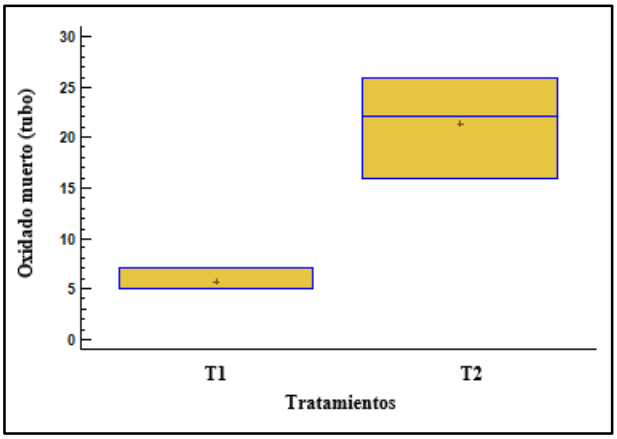


Figura 13. Distribución de medias para la variable oxidado muerto en la etapa de establecimiento

El mayor número de meristemos muertos por oxidación se reportaron en T2, cuya media se encontró en 22 aproximadamente, mientras que en T1 únicamente se evidenció entre 5 y 8 oxidados muertos.

La muerte por oxidación de los explantes se observó en su mayoría en el tratamiento 2, el cual no tuvo la presencia de agentes antioxidantes en la composición de su medio. **Sánchez y Slaverría (2004),** en su estudio indican que la aplicación de antioxidantes tuvo un efecto muy marcado en la sobrevivencia de explantes.

3.1.3.3. Viabilidad

Los resultados ANOVA señalaron que existe una diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos analizados para la variable viabilidad en la etapa de introducción (Anexo 13-B), la prueba de Tukey señaló diferencia entre T1 y T2 (Anexo 14-B).

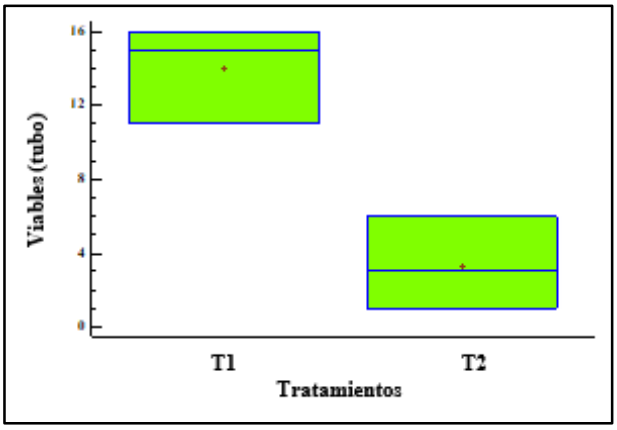
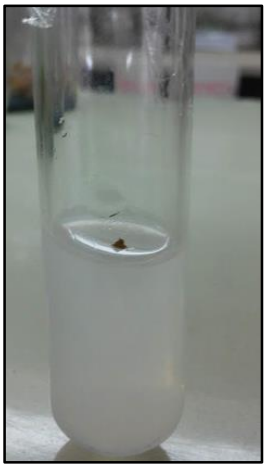


Figura 14. Distribución de medias para la variable viabilidad en la etapa de establecimiento

Se puedo observar en la figura 14 que el T1 posee mayor cantidad de explantes viables, esto puede deberse al uso de agentes antioxidantes y al cuidado al momento de sembrar para evitar contaminación por agentes patógenos presentes en el ambiente o en los instrumentos utilizados en el proceso.

3.1.3.4. Hojas y brotes

Las hojas y los brotes fueron demasiado pequeñas para llevar un seguimiento semanal, y no se pudo distinguir con facilidad los cambios, por esta razón se realizó el conteo de los mismos al momento de sembrar los nuevos retoños en los frascos de multiplicación. Se pudo observar que la cantidad de nuevas ramas primarias en todos los tubos fue aproximadamente de 4 por cada meristemo sembrado, y la cantidad de hojas fueron 3 por cada brote, los mismos que tuvieron una longitud aproximada de 1 cm.



A Meristemo a los 7 días

B. Meristemo a los 15 días

C. Meristemo a los 30 días

D. Meristemo a los 45 días

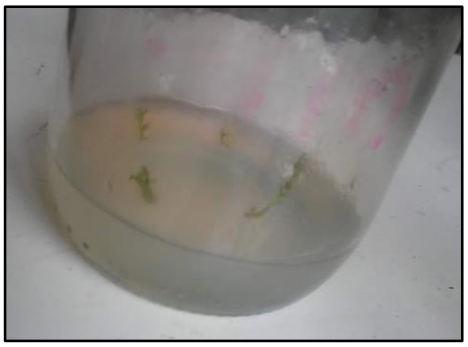
Figura 15. La figura **A** muestra el meristemo 7 días posteriores a su siembra en el medio de cultivo de concentración definida**. B** permite observar el meristemo con brotes pequeños a los 15 días. **C** los brotes presentan mayor longitud a los 30 días y finalmente **D** indica el tamaño final de los brotes en esta etapa que es de 1 cm.

Fuente: Solís, V. (2019)

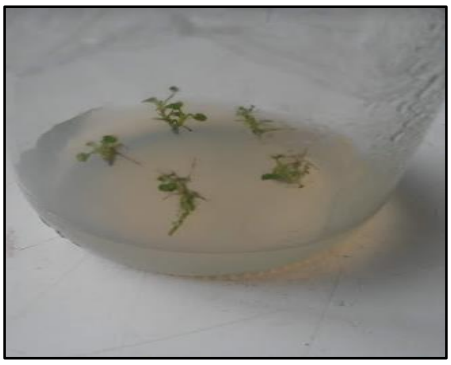
3.1.4. Etapa de multiplicación de los explantes de *Rubus rosifolius* Sm.

Como se puede observar en la figura 15, los retoños provenientes de la fase de introducción fueron sembrados sin hojas en los medios de multiplicación, según los tratamientos detallados la tabla 3. En pruebas preliminares de esta etapa, se sembraron los brotes con y sin hojas, en el primer caso estas crecían rápidamente mientras que la

rama principal no, y al estar las hojas en contacto con el medio de cultivo se oxidaron; en el segundo caso se observó que las dos variables crecieron al mismo tiempo y de mejor manera, por esta razón se decidió utilizar esta prueba.



A. Día 0 de multiplicación



B. Día 15 de multiplicación

C. Día 30 de multiplicación (5 brotes)

D. Día 30 de multiplicación (10 brotes)

E. Dia 30 de multiplicación (15 brotes)

Figura 16. Evolución de los brotes: **A** día 0 de multiplicación; **B** día 15 de multiplicación; **C** día 30 de multiplicación (5 brotes); **D** día 30 de multiplicación (10 brotes); **E** día 30 de multiplicación (15 brotes)

Fuente: Solís, V. (2019)

Como se puede observar en la figura 16 una vez identificado el mejor tratamiento para esta etapa se probó con la cantidad de retoños iniciales sembrados por frasco. Al sembrar 5 y 10, no se obtuvo gran cantidad de brotes nuevos (las pruebas realizadas con estas cantidades de explantes se utilizaron para los análisis estadísticos), mientras tanto se observó que con 15, hubo mayor proliferación, aproximadamente 10 ramas nuevas por cada brote inicial.

3.1.4.1. Cantidad de hojas

Según **Guamán (2018),** las hojas son importantes porque son las encargadas de realizar funciones vitales en la planta como la fotosíntesis, intercambio de gases y transpiración.

3.1.4.1.1. Cantidad de hojas a los 15 y 30 días

El ANOVA obtenido para la variable cantidad de hojas a los 15 días muestra una diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos (Anexo 16-B), mientras que para la variable cantidad de hojas a los 30 días no existe diferencia significativa ($p\geq0.05$) (Anexo 20-B). La prueba de Tukey realizada para cantidad de hojas a los 15 días señala la diferencia existente entre T1 y T2 (Anexo 16-B).

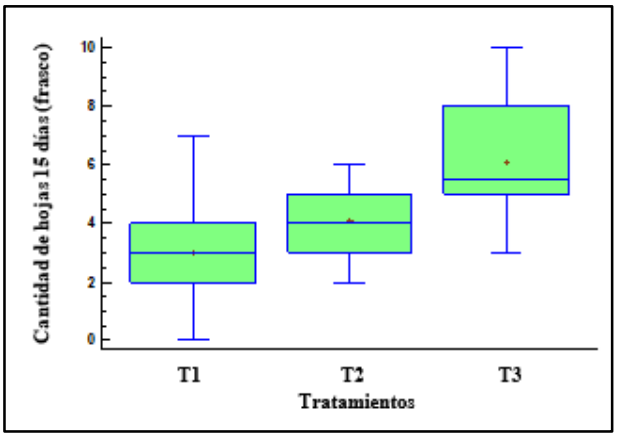


Figura 17. Distribución de medias para la variable cantidad de hojas a los 15 días en la etapa de multiplicación (prueba 1)

Como se observa en la figura 17, T3 y T1 presentaron mayor y menor número de hojas, respectivamente entre los tres tratamientos analizados a los 15 días. Las mismas muestras se contabilizaron a los 30 días y como se observa en la figura 18 se mantuvo la relación previamente reportada a los 15 días.

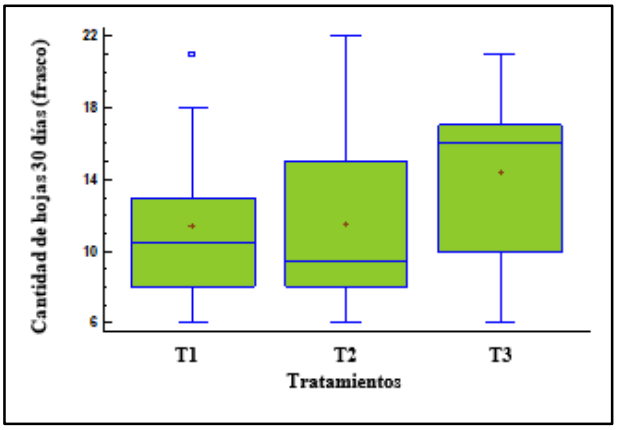


Figura 18. Distribución de medias para la variable cantidad de hojas a los 30 días en la etapa de multiplicación (prueba 1)

El ANOVA realizado expuso que no existe diferencia significativa ($p \geq 0.05$) entre los tratamientos para la variable cantidad de hojas a los 15 días (Anexo 22-B), pero si para cantidad de hojas a los 30 días ($p < 0.05$) (Anexo 24-B). La prueba de Tukey para hojas a los 30 días presentó diferencia significativa entre T2 y T3 (Anexo 25-B).

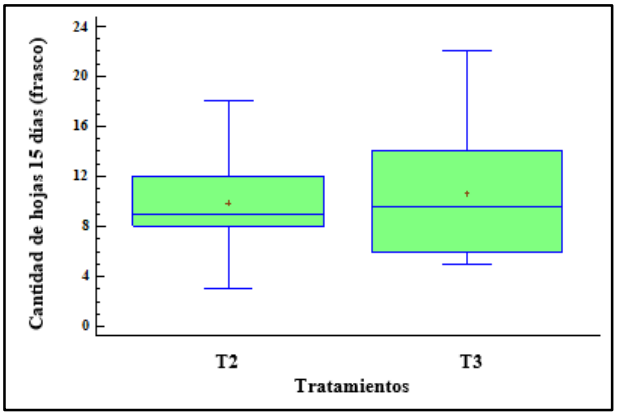


Figura 19. Distribución de medias para la variable cantidad de hojas a los 15 días en la etapa de multiplicación (prueba 2)

Tanto la figura 19 como la figura 20 indicaron que existe una mayor cantidad de hojas en T3 en las evaluaciones a los 15 y 30 días.

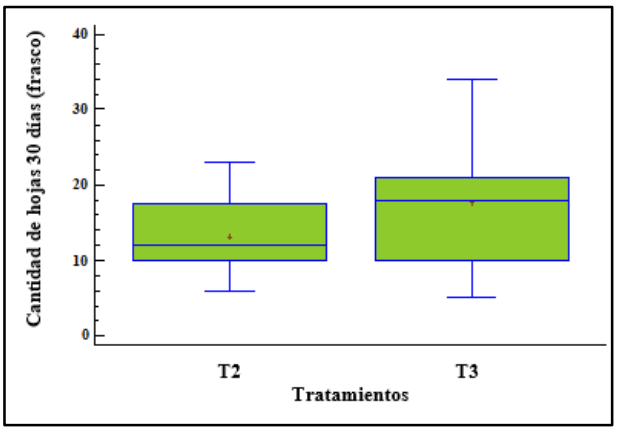


Figura 20. Distribución de medias para la variable cantidad de hojas a los 30 días en la etapa de multiplicación (prueba 2)

Los brotes iniciales sembrados en esta etapa fueron de una longitud aproximada de 1 cm. **Castro (2006),** indicó que las plantas obtenidas en su estudio realizado con *Rubus idaeus* L., tenían un tamaño entre 1 a 2 cm. El tamaño alcanzado por las hojas y los brotes sugiere que una densidad muy alta podría dificultar su desarrollo. Al sembrar 15 brotes iniciales a los 30 días se pudo observar

3.1.4.2. Cantidad de brotes

La cantidad de brotes en la micropropagación *in vitro* es de vital importancia ya que de acuerdo al número que se obtenga será posible seguir adquiriendo nuevas y más plantas a partir de cada uno de los retoños sembrados.

3.1.4.2.1. Cantidad de brotes a los 15 y 30 días

Los resultados de ANOVA para cantidad de brotes a los 15 y 30 días muestran una diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos aplicados (Anexo 17-B, Anexo 20-B), la prueba de Tukey para cantidad de hojas a los 15 días señalo que existe diferencia significativa para el contraste T1-T3 y T2-T3, mientras que T1-T2 no

presenta diferencia significativa (p≥0.05) (Anexo 18-B), por otro lado la prueba realizada para cantidad de hojas a los 30 días muestra que existe diferencia para el contraste T1-T3 y no hay diferencia en T1-T2 y T2-T3 (Anexo 21-B).

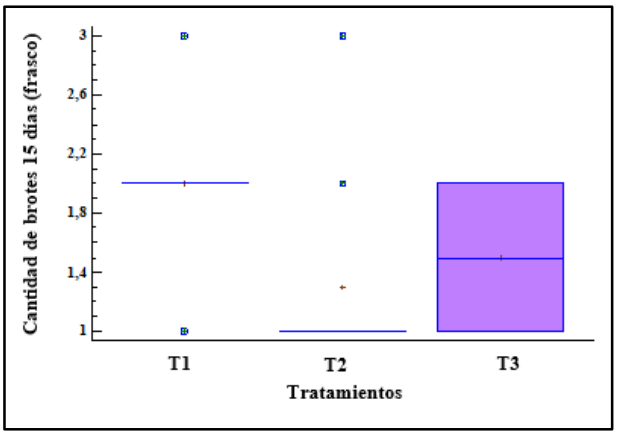


Figura 21. Distribución de medias para la variable cantidad de brotes a los 15 días en la etapa de multiplicación (prueba 1)

La figura 21 reveló que a los 15 días la mayor cantidad de brotes se presentó en T3, mientras que la figura 22, a los 30 días la mayoría obtuvo en T2 y T3, por esta razón se creyó necesario realizar una segunda prueba, esta vez descartando T1 ya que los resultados obtenidos para estas variables no fueron satisfactorios debido a que el índice de multiplicación fue muy bajo, así que se utilizó únicamente T2 y T3 con el fin de identificar cual fue el mejor tratamiento.

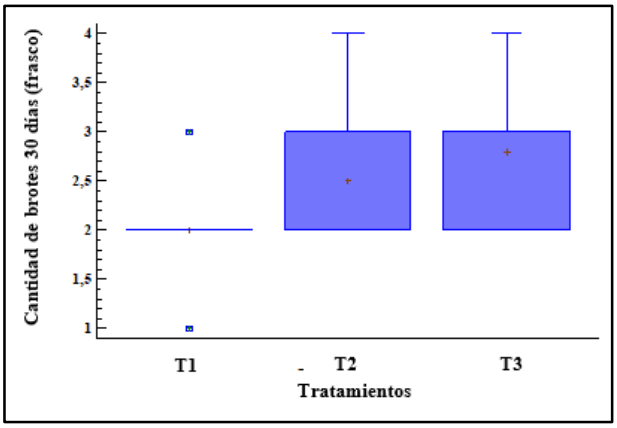


Figura 22. Distribución de medias para la variable cantidad de brotes a los 30 días en la etapa de multiplicación (prueba 1)

Los resultados ANOVA señaló que la cantidad de brotes a los 15 días no tiene diferencia significativa ($p \geq 0.05$) entre los tratamientos (Anexo 23-B), por otro lado, la cantidad de brotes a los 30 días si son significativamente diferentes ($p < 0.05$) (Anexo 26-B), se realizó Tukey y resultó en que T2 y T3 son diferentes significativamente (Anexo 27-B).

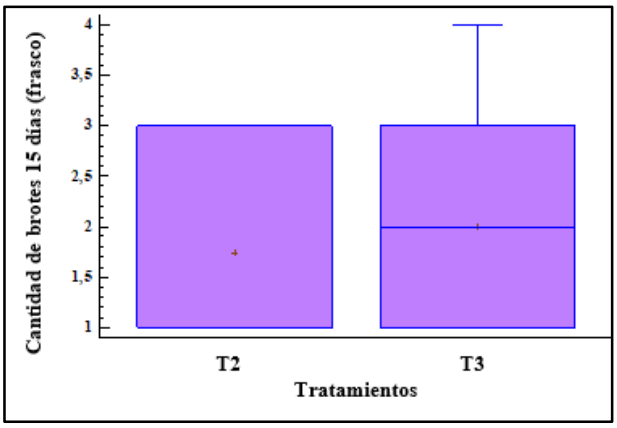


Figura 23. Distribución de medias para la variable cantidad de brotes a los 15 días en la etapa de multiplicación (prueba 2)

En cuanto a la cantidad de brotes tanto para la figura 23 y figura 24, se observó que la en ambos tratamientos es similar. Sin embargo, las medias de cada grafico señalaron que la media mayor la posee T3 a los 15 y a los 30 días.

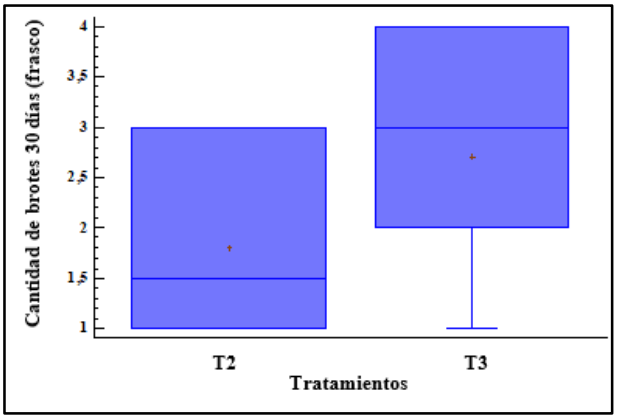


Figura 24. Distribución de medias para la variable cantidad de brotes a los 30 días en la etapa de multiplicación (prueba 2)

La longitud promedio de cada uno de los nuevos brotes oscilo entre 1.5 a 2 cm, este tamaño es mucho mayor al obtenido en la etapa de establecimiento, esto puede deberse a que en la fase de multiplicación se utilizó ácido giberélico (AG_3) 0.08 mg/L. **Guamán (2018),** concluye que la concentración de AG_3 permite obtener una mayor longitud en las plantas. Es decir las fitohormonas influyen significativamente.

3.1.5. Etapa de enraizamiento de los explantes de *Rubus rosifolius* Sm.

La formación de raíces es un proceso indujo y regulado por ciertos factores externo a la planta como temperatura, luz y composición del medio de cultivo, e internos como producción de fitohormonas, carbohidratos y compuestos fenólicos **(Rodríguez et.al, 2015)**.

3.1.5.1. Cantidad de hojas a los 15 y 30 días

Los ANOVA para cantidad de hojas a los 15 y 30 días en la etapa de enraizamiento señalaron que existe diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos analizados (Anexo 28-B, Anexo 31-B): se realizó la prueba de Tukey y se obtuvo que en la variable cantidad de hojas a los 5 días existe diferencia significativa en los contrastes T1-T5 y T5-T6 (Anexo 29-B).

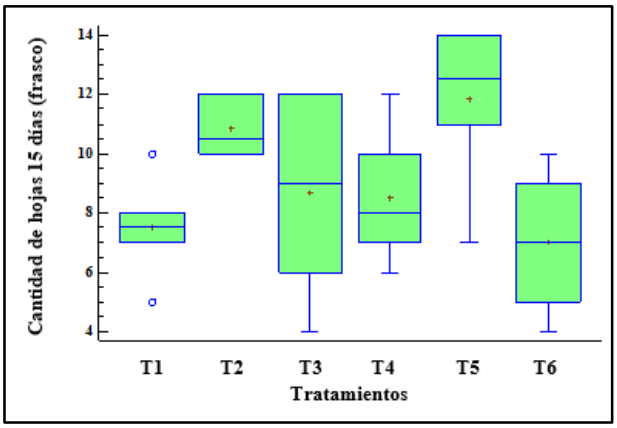


Figura 25. Distribución de medias para la variable cantidad de hojas a los 15 días en la etapa de enraizamiento

En la figura 25 se pudo observar que T5 es el que posee mayor cantidad de hojas y T1 y T6 los de menor número, la figura 26 indicó valores similares para todos los tratamientos, sin embargo, el tratamiento que sobresalió entre el grupo, fue T5.

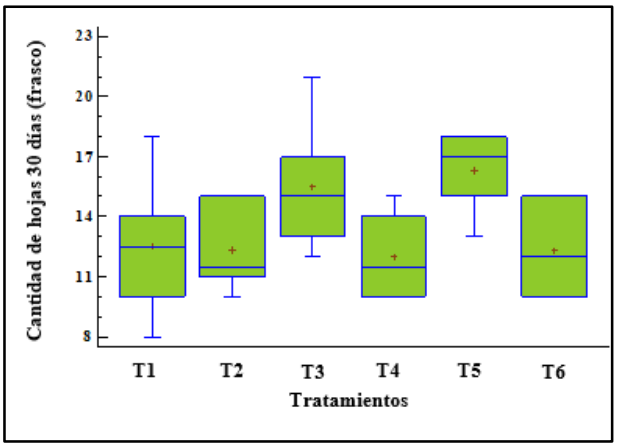


Figura 26. Distribución de medias para la variable cantidad de hojas a los 30 días en la etapa de enraizamiento

En la etapa final del cultivo *in vitro* es importante tener un gran número y tamaño de hojas para que la plántula pueda ser aclimatada posteriormente. Estas presentaron una apariencia vigorosa y como menciona **Guamán (2018),** estas características se deben a la presencia de BAP, AG_3 y el pH del medio, que en su estudio los valores para cada uno fueron: 1.5 mg/L; 0.03 mg/L; 5.8, respectivamente. Mientras tanto en este estudio los valores a los cuales se obtuvieron estas características fueron: BAP 2 mg/L; AG_3 1 mg/L; pH 5.9

3.1.5.2. Cantidad de brotes a los 15 y 30 días

Las tablas ANOVA realizadas para cantidad de brotes a los 15 y 30 días indicaron que el tratamiento a los 15 días no muestra diferencia significativa ($p \geq 0.05$) (Anexo 30-B), mientras que si existe diferencia significativa ($p < 0.05$) a los 30 días (Anexo 32-B), se realizó una prueba de Tukey y señalo que la cantidad de brotes a los 30 días muestra que los contrastes T4-T5 y T5-T6 son significativamente diferentes (Anexo 33-B).

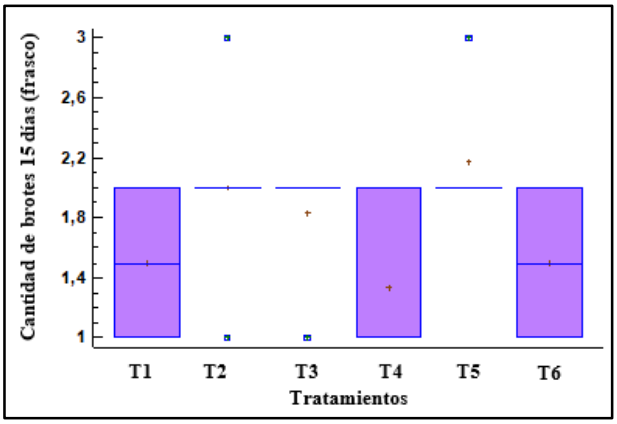


Figura 27. Distribución de medias para la variable cantidad de brotes a los 15 días en la etapa de enraizamiento

La figura 24 presentó que la cantidad de brotes son similares para T1, T4 y T6, sin embargo, los tratamientos que señalaron mayor dispersión en los datos son T2 y T5. En la figura 25, retoños a los 30 días se observa que T1, T2 y T3 son similares, mientras que T4 y T6 también son idénticas, por otro lado, T5 sobresale de entre los seis tratamientos, lo que significa que en este tratamiento existió mayor tasa de multiplicación para brotes.

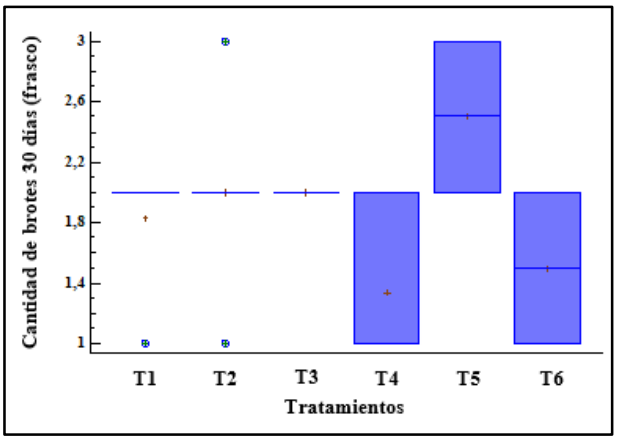


Figura 28. Distribución de medias para la variable cantidad de brotes a los 30 días en la etapa de enraizamiento

El tamaño de los brotes osciló entre 2.5 y 3 cm, los explantes iniciales para esta etapa no superaron los 2 cm de longitud, sin embargo, al colocar mayor cantidad de AG_3 los

brotes desarrollaron más su tamaño. El número de brotes al igual que en el estudio reportado por **Guamán (2018),** fue de 2 a 3 por cada brote inicial.

En cuanto a las raíces el tratamiento 5 fue el único que permitió el crecimiento de raíces, estas se evidenciaron en las dos replicas y en cada unidad experimental, como se puede observar en la figura….

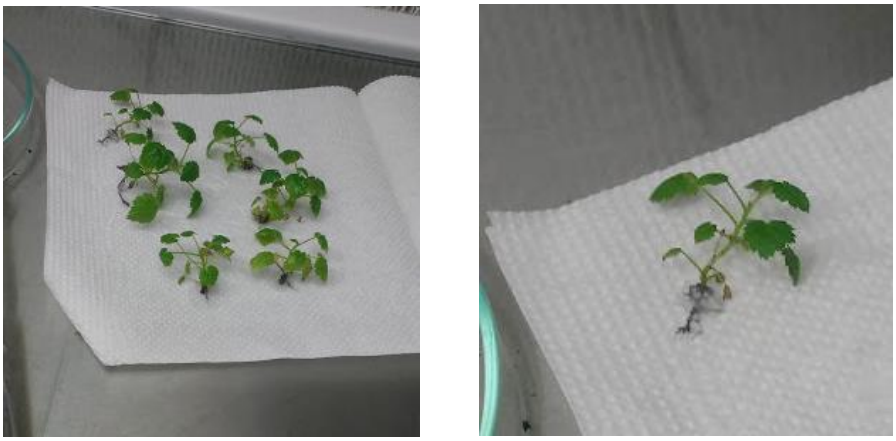


Figura 29. Plántulas con raíz resultado del tratamiento 5

3.2.Verificación de la hipótesis

Existe un equilibrio óptimo de reguladores de crecimiento vegetal, agentes antioxidantes, pH que permitirán el establecimiento, micropropagación y enraizamiento *in vitro* de frambuesa.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1.Conclusiones

Se realizó estudios preliminares con yemas axilares, con el fin de tener un punto de partida para cada etapa del proceso de micropropagación *in vitro.* De esta manera se pudo saber la composición del medio de cultivo que permitió el crecimiento de la planta y posteriormente realizar modificaciones del mismo.

Se identificó que en la etapa de desinfección el tratamiento 1 fue el que presentó mínima contaminación con hongos y bacterias, mayor cantidad de oxidados potenciales, menor porcentaje de tubos oxidados, y por lo tanto elevado porcentaje de viabilidad. El tratamiento 1 consistió en aplicar soluciones de: fungicida TRIMIX cobre 5mL / 500 mL (20 min), hipoclorito de sodio 30% (10 min), etanol 70% (1 min) y antioxidantes hasta el momento de la siembra.

Se definió que de los tratamientos estudiados en la etapa de introducción, el que presentó mejores resultados en cuanto a la menor cantidad de meristemos oxidados muertos y mayor viabilidad fue el tratamiento 1, debido a que en su composición tenía la presencia de antioxidantes (ácido cítrico y ácido ascórbico), BAP con una concentración de 1mL/L y un pH de 5.8.

Se determinó que en la fase de multiplicación el tratamiento 3 fue el que presentó mejores resultados en cuanto al número de hojas y ramas nuevas, además es importante mencionar que la cantidad ideal de brotes iniciales sembrados por cada frasco fue de 15, de esta manera se obtuvo aproximadamente 18 por cada uno. El tratamiento 3 consistió en BAP 2 mg/L.

Se estableció el medio óptimo para la etapa de enraizamiento de entre 6 diferentes fue el tratamiento 5, el cual reveló mayor número de hojas y brotes, además de la presencia de raíces en cada una de las plántulas sembradas por frasco. El número ideal de brotes por frasco para un mejor crecimiento y desarrollo de raíces fue de 10. Este tratamiento contenía BAP 2mg/L; AIB 1 mg/L.

Se determinó que el protocolo de micropropagación *in vitro* para *R. rosifolius* Sm. Fue estandarizado con los siguientes tratamientos para cada etapa del proceso: Desinfección T1; Introducción T1; Multiplicación T3 y Enraizamiento T5, siendo estos los que presentaron mejores resultados para cada variable analizada.

4.2.Recomendaciones

En la etapa de desinfección es importante limpiar bien las ramas, y remover completamente partículas de polvo, ya que estas causan contaminación por hongos una vez sembrado el explante.

Cuando las plantas madre no son tratadas de manera adecuada en campo, es mejor realizar el establecimiento *in vitro*, utilizando como explante inicial el meristemo, para evitar la pérdida de material vegetal y medios de cultivo.

Realizar pruebas microbiológicas de los nuevos explantes, con el fin de verificar que los clones están libres de patógenos.

Continuar el estudio de esta especie de frambuesa utilizando otras concentraciones en los reactivos como BAP, AIB, AG_3, pH mayores y menores con el fin de ver el efecto que producen en esta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahloowalia, B. (1998). Técnicas Radiológicas Aplicadas en la Fitogenpetica y Fitotecnia. Multiplicando los Beneficios. *Boletpin del OIEA.* 40/3.

Allccaco, J. (2016). Estandarización de un medio de cultivo para la propagación clonal *in vitro* de *Rubus idaeus* var. Heritage "frambuesa roja" de importancia comercial. Universidad Ricardo Palma.

Alvarado, Y. et al. (2003). Estrategia de trabajo para la prevención y el control de la contaminación bacteriana en la micropropagación de la caña de azúcar. Rodríguez, M et. al. (2015). Enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de microtallos de *Ugni molinae* Turcz., una especie nativa de Chile. *Scielo.* Vol. 72. No. 1. Recuperado el 12 de mayo de 2019 de: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-66432015000100002

Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana 20(1): 153-175.2009.* Recuperado 12 de mayo de 2019 de: http://www.mag.go.cr/rev_meso/v20n01_153.pdf

Bayer. (2018). Frambuesos (*Rubus idaeus*). *Crop Science*. Chile. Recuperado el 21 de febrero de 2019 de: https://www.cropscience.bayer.cl/soluciones/fichacultivo.asp?id=31

Bonilla, E. (2014). Efectos de tratamientos antioxidantes en dos medios de cultivo en el establecimiento *in vitro* de *Fragaria x ananassa* a partir de la siembra apolar de láminas foliares. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Recuperado el 11 de febrero de 2019 de: https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/3447/1/CPA-2014-015.pdf

Boufford, L. (2002). *Rubus rosifolius* Sm. Recuperado el 24 de marzo de 2019 de: https://www.doc- developpement-durable.org/file/Culture-plantes-a-petits-fuits- sucres/Framboise%20d%20Asie/Rubus%20rosifolius.pdf

Calva, G. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista digital Universitario.* Volumen 6 Número 11. ISSN: 1067-6079. Recuperado el 11 de febrero de 2019 de: http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/nov_art104a.pdf

Canomanuel, G. (2015). Agricultura y Medioambiente: Márgenes Multifuncionales. *SYNGENTA.* Recuperado de: http://www.wildlife-estates.eu/tartalom/German_Canomanuel_MFF_Syngenta.pdf

Cansino, G. (2011). Caracterización fenotípica de accesiones de esecies de *Rubus L.* de los municipios de Pmplona y Chtagá, región Nororiental de Colombia. *Scientiarum. 16. 219-233.* Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/260165476_Disponible

Carrera, M. (1974). EL FRAMBUESO. *Hojas divulgadores.* Madrid.1-74

Castillo, A. (2010). Propagación de plantas por cultivo *in vitro:* una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Recuperado de: http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf

Castro, F: (2006). *Establecimiento in vitro micropropagación de Frambuesa (Rubus idaeus L.) utilizando medio semisólido y medio líquido en RITA.* Instituto Tecnológico de Costa Rica

Ciordia, M. (2014). El cultivo del frambueso. Recuperado de: http://www.serida.org/pdfs/6085.pdf

Ciren. (2017). Frambuesa. Recuperado de: https://www.ciren.cl/wp-content/uploads/2017/12/Frambuesa.pdf

CORFO. (1988). Manual del cultivo de la Frambuesa. *Cirncorfo- 71*

Cruz, F. (2012). Micropropagación (Manual de Prácticas). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de estudios superiores cuautitlán.4-5

Daoden, E., & Sanpedro, E-E-A-I- (1982). Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. *Estación Experimental Agropecuaria San Pedro*

Díaz, A. (2009). *Diseño estadístico de experimentos*. Colombia. Segunda edición. Editorial Universidad de Antioquia. Pp. 7

Estupiñan, D. C., Schwartz, S. C. & Garzón, G. A. (2011). Antioxidant activity, total phenolics content, anthocyanin, and color stability of isotonic model beverages colored with Andes berry (*Rubus glaucus* Benth) anthocyanin powder. *Journal of food science* 76(1): S26-S34.

FAO. (2015). Macronutrientes y micronutrientes. Recuperado el 24 de marzo de 2019 de:http://www.fao.org/elearning/Course/NFSLBC/es/story_content/external_files/Macronutrientes%20y%20micronutrientes.pdf

García, J., Ara, M. (2014). *El cultivo del frambueso*. España. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). Recuperado el 11 de mayo de: http://www.serida.org/pdfs/6085.pdf

Godoy, C. (2002). La Frambuesa. Unidad Integrada Balcarce. Recuperado el 24 de marzo de 2019 de: http://www.redagraria.com/divulgaci%F3n%20t%E9cnica/articulos%20de%20dt/La%20frambuesa.htmL

Gonzales, A. et al. (2017). Protocolos de desinfección de explantes durante la micropropagación de *Cedrela odorata* L. Universidad Estatal del Sur Manabí.

Guamán, D. (2018). Desarrollo de un protocolo de establecimiento *in vitro* de mora de castillas (*Rubus glaucus* Beth) a partir de meristemos axilares (Tesis). Universidad Técnica de Ambato

Howard. (1998). *Rubus rosifolius* Sm. Recuperado el 23 de febrero de 2019 de: https://www.doc- developpement-durable.org/file/Culture-plantes-a-petits-fuits- sucres/Framboise%20d%20Asie/Rubus%20rosifolius.pdf

Hummer, K. E. (2010). *Rubus* pharmacology: antiquity to the present. *HortScience* 45(11): 1587-1591.

INEC. (2014). Uso y Manejo de Agroquímicos en la Agricultura 2014. Recuperado el 21 de enero de 2019 de:http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/Informacion_ambiental_en_la_agricultura/2016/PRESENTACION_AGRO_AMBIENTE_2016.pdf

INEC. (2018). EN el 2050 seremos 23,4 millones de ecuatorianos. Recuperado el 11 de febrero de 20129 de: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/en-el-2050-seremos-234-millones-de-ecuatorianos/

INFOAGRO. (2018). El cultivo de frambuesa. Recuperado el 14 de marzo de 2019 de: www.infoagro.com/frambueso

Infojardín. (2013). El cultivo de la frambuesa. Recuperado el 23 de diciembre de 2018 de: http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tradicionales/frambueso.htm

INIA. (2017). Cultivo de frambuesa. Recuperado el 21 de enero de 2019 de: http://www.inia.cl/wp-content/uploads/PautasdeChequeo/07.%20Pauta%20de%20chequeo%20Frambuesa_v2.pdf

Intagri. (2010). El cultivo de la Frambuesa. Recuperado el 11 de mayo de 2019 de: https://www.intagri.com/articulos/frutillas/el-cultivo-de-la-frambuesa

Jonville et al. (2011). Antiplasmodial, anti-inflammatory and cytotoxic activities of various plants extracts from the Mascare Acipelago. *Journal of Ethnoplarmacology. 136. 525-531.*

Kashiwase, H. (2015).La población mundial en el futuro en cuatro gráficos. Recuperado el 24 de marzo de 2019 de: https://blogs.worldbank.org/opendata/es/la-poblacion- mundial-en-el-futuro-en-cuatro-graficos

Krikorian, A. (1991). Medios de cultivo. Recuperado de: https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/54687

Llorente, B. (2002). Cultivo *in vitro*. Recuperado de: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/4_-_Cultivo_in_vitro.pdf?sequence=6&isAllowed=y

Mantilla, N. (2008). Estudio de pre factibilidad para la producción y comercialización de frambuesa (*Rubus idaeus*), en el mercado ecuatoriano. UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO. Recuperado de: http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/1127/1/89530.pdf

McGrath, M. (2004). ¿Qué son los fungicidas? Cornell University. Recuperado de: https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/topc/Pages/fungicidesSpanish.aspx

Morales, C. (2017). Manual de manejo agronómico del frambueso. Instituto de Desarrollo Agropecuario. *INIA.* 07

Nordeste. (2006). Medios de cultivo. Universidad Nacional del Nordeste. Recuperado de: http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf

Novoa, C. (2017). La Frambuesita, el huerto que nació de una sola planta traída desde Pamplona. *El Telégrafo.* Recuperado de: https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/regional/1/la-frambuesita-el-huerto-que-nacio-de-una-sola-planta-traida-desde-pamplona?fbclid=IwAR0m-i5YPYqn89OR8EwCx4awJnyuoAz_fIKsRQBSsGdw81AmJWuKSYLuZ1M

Oliveira et al. (2016). Antioxidant, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of *Rubus rosaefolius* phenolic extract. *Industral Crops and Products. 84. 59-66-*

ONU. (2017). Objetivos de desarrollo sostenible. Hambre cero. Recuperado de: https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/hunger/

ONU. (2017). Hambre cero: por qué es importante Recuperado de: https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/wp-content/uploads/sites/3/2016/10/2_Spanish_Why_it_Matters.pdf

Orozco, P. (2012). Establecimiento del protocolo de micropropagación de Hortensia (*Hydrangea macrophylla*) a partir de segmentos nodales, como una estrategia de producción a gran escala, para su utilización ornamental en los espacios públicos del distrito metropolitano de Quito. Escuela Politécnica del Ejército. _B6AqS5GJbhw_58kKsc#v=onepage&q&f=false

Plan Nacional del Buen Vivir. (2017). Buen vivir. Plan Nacional 2013-2017. Recuperado de: https://www.unicef.org/ecuador/Plan_Nacional_Buen_Vivir_2013-2017.pdf

Pérez, I. (2017). Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Recuperado de: http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/4694/5/Anexo%205.-%20%20Presentaci%C3%B3n%20Introduccion%20al%20Cultivo%20deTejidos.pdf

Pérez, M. (2013). *Rubus rosifolius.* Recuperado de: http://www.botanicayjardines.com/rubus-rosifolius/

Piqueras, M. (2007). Sector Agrario y Cambio Climático. *Ecologista*. 54. Recuperado de: https://www.ecologistasenaccion.org/SPIP/article17906.htmL

Quinteros, R. (1996). *Prospectiva de as agrobiotecnologías.* Recuperado de: https://books.google.com.ec/books?id=lUdW8cOp3M4C&pg=PA135&dq=seleccion%20de%20explantes&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiS87fumv_fAhWmdt8KHULCAGUQ6AEIKDAA&fbclid=IwAR1RSeSasu1-M6vXGb7n3jU3oIkoz8gMtfNjogLY

Razdan, N. (2003). *Introduction to plant tissue culture.* Science Publisher

Roca, W., Mroginski, L. (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura.* Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical

Romerolux, K. (1996). Rosaceae. In: G. Harling & L. Adersson (eds.). *Flora of Ecuador* 56: 1-152. Göteborg/Stockhol/Quito. University of Gothenburg/Riksmuseum/Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Romerolux, K., Bástidas-León, E. & Espinel, D. (2018). *Guía de Moras del Ecuador. Quito*. Publicaciones del Herbario QCA. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Salisbury, F., Ross, C. (1994). *Fisiología vegetal.* Recuperado el 11 de febrero de 2019 de:https://books.google.com.ec/books/about/Fisiolog%C3%ADa_vegetal.htmL?hl=es&id=-QlVAAAACAAJ&redir_esc=y

Sánchez, E., Ortíz, L. (2010). Riesgos y estrategias en el uso de plaguicidas. *Narraciones de la Ciencia*. 11. 21-27

Sánchez, D.; Zúñiga, K. (2017). Propuesta de desarrollo de recetas de cocina experimental con base entre frutas de la familia de las rosáceas (Tesis). Universidad de Cuenca. Recuperado el 24 de marzo de 2019 de: http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/28295/1/Proyecto%20de%20Investigacion.pdf

Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo. (2017). Plan Nacional del Buen Vivir. Recuperado de: http://www.planificacion.gob.ec/el-plan-nacional-para-el- buen-vivir-ya-esta-disponible-para-la-ciudadania/

Segretín, M. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales).

Sharry et.al. (2015). Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Recuperado el 24 de marzo de 2019 de: http://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/40919/mod_resource/content/1/plantas%20de%20probeta__.pdf-PDFA.pdf

Traversaro, L. (2013). Frambuesas, Moras y sus híbridos. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Recuperado el 11 de febrero de 2019 de: http://www.academia.edu/28608155/FRAMBUESAS_MORAS_Y_SUS_H%C3%8DBRIDOS

UEAM. (2011). Fruticultura Caducifolios. Universidad Autónoma del Estado de México. Recuperado el 24 de marzo de 2019 de: http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/31403/secme-19565.pdf?sequence=1

Undurraga, P. (2013). Manual de la frambuesa. Recuperado el 21 de enero de 2019 de: https://www.academia.edu/30136124/MANUAL_DE_LA_FRAMBUESA

Villazón, E: (2017). Micropropagación *in vitro* de dos especies del género *Rubus* a partir de tres tipos de explantes. Universidad Nacional Agraria La Molina

Recuperado el 11 de febrero de 2019 de: http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2918/F02-V544-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Varela, F. (2018). Etapas de micropropagación. Recuperado el 24 de marzo de 2019 de:https://tecnoagro.com.mx/revista/2018/no-124/etapas-de-icropropagacion/

Viada, E. (2017). Estrés oxidativo. *Scielo.* Vol. 21. Recuperado el 24 de marzo de 2019 de:http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812017000100014

Zapata, M. (2012). Cultivo de meristemos. Recuperado el 24 de marzo de 2019 de: https://www.slideshare.net/mariasalomev/cultivo-de-meristemos

ANEXOS

ANEXO A. Protocolos guías

Anexo 1-A. Protocolo de desinfección de arándano

Producto	Tiempo
Lavar las estacas con agua y detergente con un cepillo	Lavar los explantes en dirección contraria a la yema axilar
Cortar explantes	Cortar explantes en dirección contraria a la yema axilar
Desinfección	
Agua + detergente	20 minutos
Agua corriente	Enjuagar con abundante agua
Fungicida TRIMIX cobre (1mL/100mL)	15 minutos
En cámara de flujo	
Agua estéril	Dos lavados con agua estéril
Hipoclorito de sodio al 20% + 5 gotas de Tween 20 (tenso activo)	15 minutos
Agua estéril	Dos lavados con agua estéril
Etanol al 70%	1 minuto
Agua estéril	Dos lavados con agua estéril
Medio de cultivo	Sembrar en el medio de cultivo lo más rápido posible para evitar oxidación

(Laboratorio LePlant, 2017)

Anexo 2-A. Medio guía para introducción, multiplicación y enraizamiento

Reactivo	**Cantidad para 1 Litro**
Macronutrientes	10 mL
Micronutrientes	10 mL
Quelatos	10 mL
BAP	1 mL
Acido nicotínico	0.5 mL
Piridoxina	0.5 mL
Tiamina	0.4 mL
Myo inositol	0.1 g
Azúcar	30 g
Agar	8 g
pH	5.8

(Allccaco, 2016)

Anexo 3-A. Protocolo de preparación de medios de cultivo

Pasos	Descripción
Preparación de tubos	
1.	Lavar los tubos de ensayo. Colocarlos un par de horas en una solución de hipoclorito de sodio 20%.
2.	Enjuagarlos con abundante agua llave y dejarlos secar.
Preparación de frascos	
1.	Lavar bien los frascos con abundante jabón y agua.
2.	Colocarlos boca abajo para que se sequen.
Preparación del medio de cultivo	
1.	Tomar la cantidad de cada reactivo que indique el protocolo utilizado como guía, y colocar en un matraz Erlenmeyer (excepto el agar).
2.	Colocar un poco de agua destilada con el fin de homogeneizar los reactivos.
3.	Aforar con agua destilada utilizando una probeta, de acuerdo a la cantidad a la que se quiera aforar.
4.	Ajustar el pH (con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio) de acuerdo a lo especificado en la guía y de acuerdo al requerimiento de cada planta.
5.	Agregar el agar y agitar la solución.
6.	Colocar en el microondas y agitar constantemente hasta que el agar se haya disuelto completamente.
7.	Dispensar el medio en frascos (30 mL) y tubos (mL).
8.	Esterilizar los frascos y tubos .

(Laboratorio LePlant, 2019)

Anexo 4-A. Formulación medio basal Murashige y Skoog 1962

Componente	Fórmula	Cantidad (mg/L)
Macronutrientes	Nitrato de amonio - $NH\ NO_3$	1,650.000
	Nitrato de potasio – KNO_3	1,900.000
	Fosfato de potasio monobásico – KH_2PO_4	170.000
	Sulfato de magnesio heptahidratado – $MgSO_47H_2O$	370.000
	Cloruro de calcio dihidratado – $CaCl_22H_2O$	440.000
Micronutrientes	Yoduro de potasio – KI	0.830
	Ácido triocobórico – H_3BO_3	6.200
	Sulfato de manganeso monohidratado – $MnSO_4H_2O$	16.900
	Sulfato de zinc heptahidratado – $ZnSO_47H_2O$	8.600
	Molibdato de sodio – $Na_2MoO_42H_2O$	0.250
	Sulfato de cobre pentahidratado – $CuSO_45H_2O$	0.025
	Cloruro de cobalto hexahidratado – $CoCl_26H_2O$	0.025
Hierro	FeNa EDTA – Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacéptico	50.000
Vitaminas	Ácido nicotínico	0.500
	Piridoxina	0.500
	Tiamina	0.400
Antioxidante	Ácido ascórbico	150.000
	Ácido cítrico	100.000
	Cisteína	4.000
Fitohormonas	Ácido indolbutírico	0.500
	Ácido 2,4 diclofenoxiacético (2-4. D)	2.000
	Inositol	100.000
	Sacarosa	30,000.000
	Phytagel	1.800.000
pH	**5.8**	

(Bonilla, 2014)

ANEXO B. Resultados de análisis de varianza y prueba de Tukey de cada etapa y variable

Etapa de Desinfección

Contaminación

Anexo 1-B. Análisis de varianza para contaminación por hongos (etapa de desinfección)

F.V.	SC	gL	CM	RV	Valor-P
Tratamientos	6.0	1	6.00	18.00	0.01
Error	1.33333	4	0.33		
Total	7.33333	5			

Los valores-p obtenidos indican la existencia de diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 2-B. Prueba de Tukey para contaminación por hongos (etapa de desinfección)

Tratamientos	Medias	Contraste	Significancia	Diferencia
T1	0.67	T1-T2	*	-2,00
T2	2.67			

*Indica una diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 3-B. Análisis de varianza para contaminación por bacterias (etapa de desinfección)

F.V.	SC	gL	CM	RV	Valor-P
Tratamientos	0.67	1	0.67	0.50	0.52
Error	5.33	4	1.33		
Total	6.00	5			

Los valores-p obtenidos indican que no existe diferencia significativa entre los tratamientos

Oxidación

Anexo 4-B. Análisis de varianza para oxidación potencial (etapa de desinfección)

F.V.	SC	gL	CM	RV	Valor-P
Tratamientos	2.67	1	2.67	1.60	0.27
Error	6.67	4	1.67		
Total	9.33	5			

Los valores-p obtenidos indican que no existe diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 5-B. Análisis de varianza para oxidado muerto (etapa de desinfección)

F.V.	SC	gL	CM	RV	Valor-P
Tratamientos	112.67	1	112.67	13.80	0.02
Error	32.67	4	8.17		
Total	145.33	5			

Los valores-p obtenidos indican la existencia de diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 6-B. Prueba de Tukey para oxidado muerto (etapa de desinfección)

Tratamientos	Medias	Contraste	Significancia	Diferencia
T1	5.33	T1-T2	*	-8,67
T2	14.00			

*Indica una diferencia significativa entre los tratamientos

Viabilidad

Anexo 7-B. Análisis de varianza para viables (etapa de desinfección)

F.V.	SC	gL	CM	RV	Valor-P
Tratamientos	150.00	1	150.00	45.00	0.0026
Error	13.33	4	3.33		
Total	163.33	5			

Los valores-p obtenidos indican la existencia de diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 8-B. Prueba de Tukey para viables (etapa de desinfección)

Tratamientos	Medias	Contraste	Significancia	Diferencia
T1	15.33	T1-T2	*	10.00
T2	5.33			

*Indica una diferencia significativa entre los tratamientos

Etapa de Introducción

Oxidación

Anexo 9-B. Análisis de varianza para oxidación potencial (etapa de introducción)

F.V.	SC	gL	CM	RV	Valor-P
Tratamientos	37.50	1	37.50	8.65	0.04
Error	17.33	4	4.33		
Total	54.83	5			

Los valores-p obtenidos indican la existencia de diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 10-B. Prueba de Tukey para oxidación potencial (etapa de introducción)

Tratamientos	Medias	Contraste	Significancia	Diferencia
T1	5.33	T1-T2	*	5.00
T2	10.33			

*Indica una diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 11-B. Análisis de varianza para oxidado muerto (etapa de introducción)

F.V.	SC	gL	CM	RV	Valor-P
Tratamientos	368.17	1	368.17	27.61	0.0063
Error	53.33	4	13.33		
Total	421.50	5			

Los valores-p obtenidos indican la existencia de diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 12-B. Prueba de Tukey para oxidado muerto (etapa de introducción)

Tratamientos	Medias	Contraste	Significancia	Diferencia
T1	5.67	T1-T2	*	-15.00
T2	21.33			

*Indica una diferencia significativa entre los tratamientos

Viabilidad

Anexo 13-B. Análisis de varianza para viables (etapa de introducción)

F.V.	SC	gL	CM	RV	Valor-P
Tratamientos	170.67	1	170.67	25.60	0.0072
Error	26.67	4	6.67		
Total	197.33	5			

Los valores-p obtenidos indican la existencia de diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 14-B. Prueba de Tukey para viables (etapa de introducción)

Tratamientos	Medias	Contraste	Significancia	Diferencia
T1	14.00	T1-T2	*	10.67
T2	3.33			

*Indica una diferencia significativa entre los tratamientos

Etapa de Multiplicación

Prueba 1

Hojas y brotes a los 15 días

Anexo 15-B. Análisis de varianza para hojas a los 15 días (etapa de multiplicación, prueba 1)

F.V.	SC	gL	CM	RV	Valor-P
Tratamientos	49.40	2	24.70	7.77	0.0022
Error	85.80	27	30.18		
Total	135.20	29			

Los valores-p obtenidos indican la existencia de diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 16-B. Prueba de Tukey para hojas a los 15 días (etapa de multiplicación, prueba 1)

Tratamientos	Medias	Contraste	Significancia	Diferencia
T1	14.00	T1-T2	*	10.67
T2	3.33			

*Indica una diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 17-B. Análisis de varianza para brotes a los 15 días (etapa de multiplicación, prueba 1)

F.V.	SC	gL	CM	RV	Valor-P
Tratamientos	2.60	2	1.30	4.08	0.03
Error	8.60	27	0.32		
Total	11.20	29			

Los valores-p obtenidos indican la existencia de diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 18-B. Prueba de Tukey para brotes a los 15 días (etapa de multiplicación, prueba 1)

Tratamientos	Medias	Contraste	Significancia	Diferencia
T1	3.00	T1-T2		-1.10
T2	4.10	T1-T3	*	-3,10
T3	6.10	T2-T3	*	-2.00

*Indica una diferencia significativa entre los tratamientos

Hojas y brotes a los 30 días

Anexo 19-B. Análisis de varianza para hojas a los 30 días (etapa de multiplicación, prueba 1)

F.V.	SC	gL	CM	RV	Valor-P
Tratamientos	58.07	2	29.03	1.17	0.33
Error	669.30	27	24.79		
Total	727.37	29			

Los valores-p obtenidos indican que no existe diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 20-B. Análisis de varianza para brotes a los 30 días (etapa de multiplicación, prueba 1)

F.V.	SC	gL	CM	RV	Valor-P
Tratamientos	3.27	2	1.63	4.37	0.03
Error	10.10	27	0.37		
Total	13.37	29			

Los valores-p obtenidos indican la existencia de diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 21-B. Prueba de Tukey para brotes a los 30 días (etapa de multiplicación, prueba 1)

Tratamientos	Medias	Contraste	Significancia	Diferencia
T1	2.00	T1-T2		-0.50
T2	2.50	T1-T3	*	-0,80
T3	3.80	T2-T3		-0.30

*Indica una diferencia significativa entre los tratamientos

Prueba 2

Hojas y brotes a los 15 días

Anexo 22-B. Análisis de varianza para hojas a los 15 días (etapa de multiplicación, prueba 2)

F.V.	SC	gL	CM	RV	Valor-P
Tratamientos	6.40	1	6.40	0.34	0.56
Error	712.00	38	18.74		
Total	718.40	39			

Los valores-p obtenidos indican que no existe diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 23-B. Análisis de varianza para brotes a los 15 días (etapa de multiplicación, prueba 2)

F.V.	SC	gL	CM	RV	Valor-P
Tratamientos	0.63	1	0.63	0.70	0.41
Error	33.75	38	0.88		
Total	34.38	39			

Los valores-p obtenidos indican que no existe diferencia significativa entre los tratamientos

Hojas y brotes a los 30 días

Anexo 24-B. Análisis de varianza para hojas a los 30 días (etapa de multiplicación, prueba 2)

F.V.	SC	gL	CM	RV	Valor-P
Tratamientos	193.60	1	193.60	4.82	0.03
Error	1526.00	38	40.16		
Total	1719.60	39			

Los valores-p obtenidos indican la existencia de diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 25-B. Prueba de Tukey para hojas a los 30 días (etapa de multiplicación, prueba 2)

Tratamientos	Medias	Contraste	Significancia	Diferencia
T2	13.20	T2-T3	*	-4.40
T3	17.60			

*Indica una diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 26-B. Análisis de varianza para brotes a los 30 días (etapa de multiplicación, prueba 2)

F.V.	SC	gL	CM	RV	Valor-P
Tratamientos	8.10	1	8.10	8.23	0.0067
Error	37.40	38	0.98		
Total	45.50	39			

Los valores-p obtenidos indican la existencia de diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 27-B. Prueba de Tukey para brotes a los 30 días (etapa de multiplicación, prueba 2)

Tratamientos	Medias	Contraste	Significancia	Diferencia
T2	1.80	T2-T3	*	0.64
T3	2.70			

*Indica una diferencia significativa entre los tratamientos

Etapa de Enraizamiento

Hojas y brotes a los 15 días

Anexo 28-B. Análisis de varianza para hojas a los 15 días (etapa de enraizamiento)

F.V.	SC	gL	CM	RV	Valor-P
Tratamientos	107.89	5	21.58	4.10	0.0059
Error	158.00	30	5.27		
Total	265.89	35			

Los valores-p obtenidos indican la existencia de diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 29-B. Prueba de Tukey para hojas a los 15 días (etapa de enraizamiento)

Tratamientos	Medias	Contraste	Significancia	Diferencia
T1	7.50	T1-T5	*	-4.33
T2	10.83	T5-T6	*	4.83
T3	8.67			
T4	8.50			
T5	11.83			
T6	7.00			

*Indica una diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 30-B. Análisis de varianza para brotes a los 15 días (etapa de enraizamiento)

F.V.	SC	gL	CM	RV	Valor-P
Tratamientos	3.22	5	0.64	2.42	0.06
Error	8.00	30	0.27		
Total	11.22	35			

Los valores-p obtenidos indican que no existe diferencia significativa entre los tratamientos

Hojas y brotes a los 30 días

Anexo 31-B. Análisis de varianza para hojas a los 30 días (etapa de enraizamiento)

F.V.	SC	gL	CM	RV	Valor-P
Tratamientos	108.00	5	21.60	3.22	0.02
Error	201.00	30	6.70		
Total	309.00	35			

Los valores-p obtenidos indican la existencia de diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 32-B. Análisis de varianza para brotes a los 30 días (etapa de enraizamiento)

F.V.	SC	gL	CM	RV	Valor-P
Tratamientos	5.14	5	1.03	4.30	0.0045
Error	7.17	30	0.24		
Total	12.31	35			

Los valores-p obtenidos indican la existencia de diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 33-B. Prueba de Tukey para brotes a los 30 días (etapa de enraizamiento)

Tratamientos	Medias	Contraste	Significancia	Diferencia
T1	1.83	T4-T5	*	-1.17
T2	2.00	T5-T6	*	-1.00
T3	2.00			
T4	1.33			
T5	2.50			
T6	1.50			

*Indica una diferencia significativa entre los tratamientos

ANEXO C. Imágenes del procedimiento y los resultados de cada etapa del proceso

Pasos previos a la desinfección

Anexo 1-C. Recepción del material vegetal

Anexo 2-C. Corte de hojas y espinas

Anexo 3-C. Colocación de ramas en agua jabonosa y cepillado

Anexo 4-C. Lavado de ramas con agua llave

Anexo 5-C. Corte de yemas axilares

Anexo 6-C. Colocación de explantes en frascos estériles

Desinfección

Anexo 7-C. Agua jabonosa

Anexo 8-C. Fungicida 1mL/100mL

Anexo 9-C. Hipoclorito de sodio 30%

Anexo 10-C. Etanol 70%

Antioxidante 11-C. Antioxidante

Extracción y siembra de meristemos

Anexo 12-C. Trabajo en la cámara de flujo laminar

Anexo 13-C. Miniestacas desinfectadas

Anexo 14-C. Miniestaca vista a través del estereoscopio

Anexo 15-C. Miniestaca con meristemo

Anexo 16-C. Meristemo visto a través del estereoscopio