



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

“PROPAGACIÓN IN VITRO DEL CULTIVO DE MORA SIN ESPINAS (*Rubus glaucus benth*) EN EL CANTON CEVALLOS PROVINCIA TUNGURAHUA”

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de Ingeniero Agrónomo.

Autores:

Calapiña Malliquinga Oscar Fernando

Chacón Tubón Carlos Andrés

Tutor:

Ing. Mg. Espinosa Cunuhay Kleber Augusto

**LA MANÁ-ECUADOR
SEPTIEMBRE-2020**

DECLARACIÓN DE AUTORIA

Yo, Calapiña Malliquinga Oscar Fernando y Chacón Tubón Carlos Andrés, declaramos ser los autores del presente proyecto de investigación “PROPAGACIÓN IN VITRO DEL CULTIVO DE MORA SIN ESPINAS (*Rubus glaucus benth*) EN EL CANTON CEVALLOS PROVINCIA TUNGURAHUA”, siendo el Ing. Kleber Augusto Espinosa Cunuhay tutor del presente trabajo, y eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certificamos que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de nuestra exclusiva responsabilidad.



Calapiña Malliquinga Oscar Fernando
C.I:055007099-9



Chacón Tubón Carlos Andrés
C.I: 055005974-5

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte, Calapiña Malliquinga Oscar Fernando identificada/o con C.C. N° 055007099-9, y Chacón Tubón Carlos Andrés identificada/o con C.C. N° 055005974-5 de estado civil **solteros** y con domicilio en Latacunga, a quien en lo sucesivo se denominará **LA/EL CEDENTE**; y, de otra parte, el Ing. MBA. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez, en calidad de Rector y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez Barrio El Ejido Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - **LA/EL CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de **Ingeniería Agronómica**, titulares de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “**Propagación in vitro del cultivo de mora sin espina (*Rubus glaucus Benth*) en el cantón Cevallos Provincia de Tungurahua**” la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad según las características que a continuación se detallan:

Historial académico. – Septiembre 2015 – Septiembre 2020

Aprobación HCA.-

Tutor.- Ing. MSc. Kleber Augusto Espinosa Cunuhay

Tema: “**Propagación in vitro del cultivo de mora sin espina (*Rubus glaucus Benth*) en el cantón Cevallos Provincia de Tungurahua**”

CLÁUSULA SEGUNDA.- LA CESIONARIA es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA.- Por el presente contrato, **LA/EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA.- OBJETO DEL CONTRATO: Por el presente contrato **LA/EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.

d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.

f) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA.- El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **LA/EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA.- El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA.- CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD.- Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **LA/EL CEDENTE** podrá utilizarla.

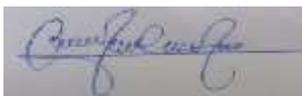
CLÁUSULA OCTAVA.- LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS.- LA CESIONARIA podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **LA/EL CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA.- El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en las cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA.- En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA.- Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga a los 7 días del mes de Septiembre del 2020.



Calapiña Malliquinga Oscar Fernando
EL CEDENTE



Chacón Tubón Carlos Andrés
EL CEDENTE

Ing. MBA. Cristian Tinajero Jiménez
EL CESIONARIO

AVAL DEL TUTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACION

En la calidad de tutor del trabajo de Investigación sobre el título:

“PROPAGACIÓN IN VITRO DEL CULTIVO DE MORA SIN ESPINAS (*Rubus glaucus benth*) EN EL CANTON CEVALLOS PROVINCIA TUNGURAHUA”, de los señores Calapiña Malliquinga Oscar Fernando y Chacón Tubón Carlos Andrés, de la carrera de Ingeniería Agronómica, considero que dicho Informe Investigativo cumple con los requisitos metodológicos y aportes científicos- técnicos suficientes para ser sometidos a la evaluación de tribunal de Validación de Proyectos que el Honorable Consejo Académico de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Universidad Técnica de Cotopaxi designe para su correspondiente estudio y calificación.

La Mana, Septiembre 2020



Ing. Mg. Kleber Augusto Espinosa Cunuhay

CI: 0502612740

TUTOR

APROBACION DEL TRIBUNAL DE TITULACION

En calidad del Tribunal de Lectores, aprueban el presente informe de investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi, y por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales: por cuenta de los postulantes Calapiña Malliquinga Oscar Fernando y Chacón Tubòn Carlos Andrés, con el Título de Proyecto de Investigación, Propagación in vitro del cultivo de mora sin espinas (*Rubus glaucus benth*) en el Cantón Cevallos Provincia Tungurahua ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto Sustentación del Proyecto.

Por lo antes expuesto, se autoriza realizar los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

La Mana, Septiembre 2020

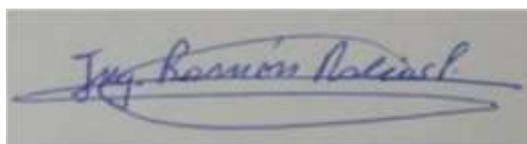
Para constancia firman:



Ing. Wellington Pincay Ronquillo
C.I: 120638458-6
LECTOR 1 PRESIDENTE



Ing. Cristian Tapia Ramírez
C.I: 050278441-6
LECTOR 2 MIEMBRO



Ing. Ramón Macías Pettao
C.I: 091074328-5
LECTOR 3 SECRETARIO

AGRADECIMIENTO

En primera instancia agradecemos a Dios por ser el principal motor de nuestras vidas que nos permitió alcanzar una meta más en nuestras vidas de estudiantes, a la Universidad Técnica de Cotopaxi por habernos dado la bienvenida al mundo como tal y haberme brindado muchas oportunidades, a mis formadores personas con grandes sabidurías quienes nos han brindado sus conocimientos experiencias, a nuestros padres, hermanos, que nos brindaron su apoyo su cariño incondicional y económico a lo largo de estos años, para poder llegar un profesional.

Andrés, Oscar

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo lo dedicamos principalmente a Dios, por ser el inspirador y darnos fuerza para continuar, en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados. A nuestros padres por su amor, trabajos y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes hemos logrado llegar hasta aquí y convertirnos en lo que somos. Ha sido el orgullo y el privilegio de ser sus hijos son los mejores padres, de igual manera a mis docentes por su enseñanza para terminar este proceso investigativo, espero poder contar siempre con su apoyo incondicional.

Andrés, Oscar

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TEMA: PROPAGACIÓN IN VITRO DEL CULTIVO DE MORA SIN ESPINAS (*Rubus glaucus benth*) EN EL CANTON CEVALLOS PROVINCIA TUNGURAHUA.

Autores: Calapiña Malliquinga Oscar Fernando
Chacón Tubón Carlos Andrés

RESUMEN

La mora de castilla es de mayor importancia comercial y cultivada, es una de las frutas más apetecidas y cultivadas en el mundo, la investigación se realizó con el propósito de desarrollar un protocolo para la propagación masiva vía in vitro de la mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*). A partir de yemas axilares ya que el fruto ha tenido una gran demanda en el mercado nacional e internacional. los objetivos planteados en esta investigación fueron: Identificar el explante de partida adecuado para ser introducido al laboratorio; establecer las condiciones adecuadas para la esterilización del material de partida; determinar el medio de cultivo adecuado para la multiplicación de cultivo in vitro de mora, utilizando diferentes hormonas de crecimiento. El trabajo se realizó en el laboratorio BITRO PLANTAS en el Cantón Cevallos Provincia de Tungurahua, la extracción del material vegetativo fue en el mismo lugar, se desarrolló con la utilización de hormonas de crecimiento como son (auxina, citoquinina, giberelina) y la combinación de estas con dosis de 2m/L, 4ml/L, 1ml/L en un diseño de (DBCA). En cuanto al número de explantes contaminados (NEC) se registró a los 30 días antes del ingreso a la fase multiplicación. El tratamiento que sobresalió es el T5 (giberelina más la combinación de la auxina), las variables registradas fueron la longitud de los brotes (LB) a los 70 días. En la variable del número de brotes por explante (NBE) el tratamiento que sobresalía el T1 (citoquinina) a los 70 días. La variable en número de hojas por explante (NHE), el tratamiento que sobresalía es T5 (giberelina en combinación de la auxina) a los 70 días que se tomó los datos, siendo que el T1 y el T5 es el que se debe aplicar en las diferentes propagaciones in vitro para la formación de plantas de calidad.

Palabras claves: Propagación, auxinas, citoquininas, giberelinas, material vegetativo.

ABSTRACT

The blackberry has great commercial importance, it is one of the most desired and cultivated fruits in the world. The research was carried out to develop a protocol for the massive propagation via in vitro of the blackberry (*Rubus glaucus* Benth). From axillary buds since the fruit has been in great demand in the national and international markets. The objectives set out in this research were: to identify the appropriate starting explant to be introduced to the laboratory; to establish the appropriate conditions for the sterilization of the starting material; to determine the appropriate culture medium for the multiplication of blackberry in vitro culture, using different growth hormones. The work was carried out in the BITRO PLANTAS laboratory in the Cevallos canton, Province of Tungurahua, the extraction of the vegetative material was in the same place. It was developed with the use of growth hormones such as (auxin, cytokinin, gibberellin) and the combination of these with doses of 2m/L, 4ml/L, 1ml/L in a (DBCA) design. Regarding the number of contaminated explants (NEC), it was recorded 30 days before entering the multiplication phase. The treatment that stood out was T5 (gibberellin plus the auxin combination), the variables recorded were the length of the shoots (BL) at 70 days. In the variable of the number of shoots per explant (NBE) treatment that exceeded the T1 (cytokinin) at 70 days. The variable in the number of leaves per explant (NHE), the treatment that stood out is T5 (gibberellin in combination with auxin wing) at 70 days that the data was taken, being that T1 and T5 have to be applied in the different in vitro propagations for the formation of quality plants.

Keywords: Propagation, auxins, cytokinins, giberelins, vegetative material.

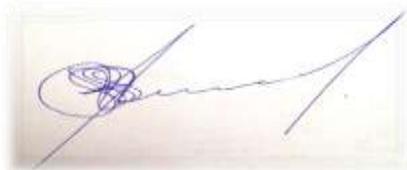
AVAL DE TRADUCCIÓN

En calidad de Docente del Idioma Inglés del Centro de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi; en forma legal CERTIFICO que: La traducción del resumen del proyecto de investigación al idioma Inglés presentado por los estudiantes Egresados de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Calapiña Malliquinga Oscar Fernando y Chacón Tubón Carlos Andrés, cuyo título versa “PROPAGACIÓN IN VITRO DEL CULTIVO DE MORA SIN ESPINAS (*Rubus glaucus benth*) EN EL CANTON CEVALLOS PROVINCIA TUNGURAHUA”, lo realizaron bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del Idioma.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad y autorizo las peticiones hacer uso del presente certificado de la manera ética que considere conveniente.

La Maná, Septiembre del 2020

Atentamente,



MSc. Ramón Amores Sebastián Fernando
C.I: 050301668-5
DOCENTE DEL CENTRO DE IDIOMAS

ÍNDICE GENERAL

PORTADA	i
DECLARACIÓN DE AUTORIA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR.....	iv
AVAL DEL TUTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACION	v
APROBACION DEL TRIBUNAL DE TITULACION.....	vi
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIA.....	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
AVAL DE TRADUCCIÓN.....	xi
ÍNDICE GENERAL.....	xv
ÍNDICE DE TABLAS.....	xvi
ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
ÍNDICE DE ANEXOS	xviii
1. INFORMACIÓN GENERAL.....	1
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	2
3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	3
4. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO.....	4
5. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	4
6. OBJETIVOS	5
7. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN DE LOS OBJETIVOS PLANTEADOS	6
8. FUNDAMENTACION CIENTIFICA TECNICA.....	7
8.1. Origen de la mora de castilla	7
8.2. Mora de castilla con espina	8
8.2.1. Sistema de propagación.....	8
8.2.2. Tutorio	8
8.2.3. Podas.....	8
8.2.4. Plagas y enfermedades	8
8.2.5. Duración del cultivo	9
8.3. Situación del cultivo en el Ecuador.....	9
8.3.1. Cultivo de mora en el Ecuador	9

8.3.2. Superficie cultivada	9
8.3.3. Importancia económica.....	9
8.3.4. Beneficios de su consumo de mora	10
8.4. Composición nutricional de la mora.....	10
8.5. Descripción de la planta de mora	11
8.6. Descripción botànica y agronómica de la mora.....	13
8.6.1. Botànica de la mora	13
8.6.2. Raíz.....	13
8.6.3. Tallo.....	14
8.6.4. Ramas	14
8.6.5. Hojas.....	14
8.6.6. Flores	14
8.7. Fenología del cultivo de mora sin espinas.....	15
8.7. Requerimientos climatológicos	15
8.8.1. Clima	15
8.8.2. Suelo	15
8.8.3. Temperatura.....	15
8.8.4. Altitud.....	16
8.8.5. Precipitación pluvial.....	16
8.8.6. Humedada relativa.....	16
8.9. Propagación	16
8.9.1. Estacas	16
8.9.2. Acodos.....	16
8.9.3. Acodo rastrero	16
8.9.4. Acodo punta.....	17
8.9.5. Propagación por raíz o fragmentos de tallos subterranos	17
8.10. Plagas del cultivo de mora sin espinas	17
8.11. Enfermedades de la mora sin espinas	18
8.12. Cultivo in vitro	19
8.13. Etapas de propagación in vitro	20
8.13.1. Primera etapa	20
8.13.2. Seleccin del explante	20
8.13.3. Genotipo	20

8.13.4. Edad de la planta.....	20
8.14. Micropropagación.....	21
8.15. Cultivo de tejidos.....	21
8.16. Reguladores de crecimiento.....	22
8.16.1. Las auxinas	22
8.16.2. Citoquininas	22
8.16.3. Giberelinas.....	22
8.17. Agentes gelificantes.....	23
8.18. Protocolo de desinfección.....	23
8.19. Factores limitantes.....	23
8.19.1. Fenolización	23
8.19.2. Contaminación.....	24
8.20. Requerimientos para e cultivo in vitro	24
8.21. Recipientes para el cultivo.....	25
9. PREGUNTAS CIENTIFICAS O HIPOTESIS	25
10. DISEÑO METOLÒGICO	26
10.1. Ubicación y duración del proyecto	26
10.2. Tipo de investigación	26
10.2.1. Técnicas	26
10.3. Materiales y equipos.....	27
10.4. Condiciones meteorològicas.....	28
10.5. Diseño experimental.....	28
10.5.1. Esquema del experimento.....	28
10.6. Manejo metodològico del ensayo	29
10.6.1. Selección y preparación del material vegetal	29
10.6.2. Àrea de lavado y destilación.....	29
10.6.3. Establecimiento del cultivo asèptico	30
10.6.4. Primera desinfección	30
10.6.5. Segunda desinfección	30
10.7. Ingresoy desinfección de la càmara de flujo laminar	30
10.8. Introducciòn del material in vitro	31
10.8.1. Siembra del explante en e medio de cultivo	31
10.8.2. Traslado al cuarto de crecimiento.....	31

10.8.3. Nùmero de explantes contaminados (NEC)	31
10.9. Fase de multiplicaciòn	32
10.10. Variables evaluadas	32
10.10.1. Longitud de los brotes (LB)	32
10.10.2. Nùmero de brotes por explante (NBE)	33
10.10.3. Nùmero de hojas por brote (NHB)	33
10.10.4. Elaboraciòn del protocolo.....	33
11. ANALISIS Y DISCUSIÒN DE LOS RESULTADOS.....	33
11.1. Variables Agronomicas. Nùmero de explantes contaminados (NEC) a los 30 días, antes de entrar a la fase de multiplicaciòn.	33
11.2. Variable de longitud de los brotes (LB) durante los 70 días que se encontraba en la fase de multiplicaciòn.	34
11.3. Variable del nùmero de brotes por explante (NBE) durante los 70 días que se encontraba en la fase de multiplicaciòn	35
11.4. Variable del nùmero de hojas por explante (NHE) a los 70 días de haberse encontrado en la fase de multiplicaciòn	36
11.5. Protocolo establecido.....	38
11.6. Anàlisis de costo.....	40
12. IMPACTO (tecnico, social, ambiental o economico)	40
13. PRESUPUESTO.....	41
14. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
14.1. Conclusiones.....	43
14.2. Recomendaciones	43
15. BIBLIOGRAFÌA	45
16. ANEXOS	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividades y sistema de tareas en relación de los objetivos planteados	6
Tabla 2. Composición nutricional de la mora.....	11
Tabla 3. Clasificación botánica de la mora.....	13
Tabla 4. Materiales y equipos ue se utilizaron en la investigación	27
Tabla 5. Condiciones meteorológicas controladas	28
Tabla 6. Esquema de la fuente de variación y grados de libertad	28
Tabla 7. Manejo metodológico de ensayo	29
Tabla 8. Dosis de cada una de las hormonas y combinación que se realizó en la fase de multiplicación	32
Tabla 9. Resultado del número de explantes contaminados (NEC) a los 30 días antes de entrar a la fase de multiplicación	34
Tabla 10. Resultado de la variable de longitud de los brotes (LB) durante los 70 días	35
Tabla 11. Resultado de la variable del número de brotes por explante (NBE) a los 70 días ...	36
Tabla 12. Resultado de la variable del número de hojas por explante (NHE) a los 70 días.....	37
Tabla 13. Análisis de costos de la investigación	40
Tabla 14. Presupuesto de la investigación.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de proceso de rutina de multiplicación in vitro plantas.....	25
Figura 2. Porcentaje de explantes contaminados a días de ser transferido a la fase de multiplicación	34

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Hoja de vida del docente tutor	50
Anexo 2. Hoja de vida del estudiante investigador	51
Anexo 3. Hoja de vida del estudiante investigador	52
Anexo 4. Fotografías de preparación del medio de cultivo en la fase de introducción.....	53
Anexo 5. Fotografías del material vegetal siendo introducido a la fase de introducción.....	53
Anexo 6. Fotografías de medios de cultivo contaminados en la fase de introducción.....	54
Anexo 7. Fotografías de la preparación de medios de cultivo en la fase de multiplicación.....	54
Anexo 8. Fotografías de introducción del material vegetal a la fase de multiplicación.....	55
Anexo 9. . Fotografías de tratamientos que mejor resultados presentaron en la investigación	55
Anexo 10. Fotografías de los resultados de los tratamientos aplicados en la investigación ...	56
Anexo 11. Fotografías de toma de datos.	57

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto	Propagación in vitro del cultivo de mora Sin espinas (<i>rubus glaucus benth</i>) en el Cantón Cevallos provincia Tungurahua.
Tiempo de ejecución:	8 meses
Fecha de inicio:	Diciembre 2019
Fecha de finalización:	Agosto 2020
Lugar de ejecución	Laboratorio de biotecnología que se Encuentra ubicado en el Cantón Cevallos Provincia Tungurahua
Unidad Académica que auspicia:	Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.
Carrera que auspicia:	Ingeniería Agronómica
Proyecto de investigación vinculado:	Al Sector Agrícola
Equipo de Trabajo	Autores: Chacón Tubón Carlos Andrés Calapiña Malliquinga Oscar Fernando Tutor: Ing. Kleber Augusto Espinosa Cunuhay
Área de Conocimiento	08 Agricultura, Silvicultura, Pesca y Veterinaria
Línea de investigación	Desarrollo de Seguridad Alimentaria
Sub líneas de investigación de la Carrera:	Producción Agrícola Sostenible

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

El proyecto se realizó en el cantón Cevallos Provincia de Tungurahua, en el laboratorio de biotecnología Vitro Plantas, el proyecto realizado fue propagación in vitro de cultivo de mora sin espina, se elaboró 70 medios de cultivo con diferentes hormonas (Citosina, giberelina, Auxina)

Con diferentes hormonas de crecimiento y un testigo para demostrar con cuál de las hormonas se obtuvo un mejor resultado en su desarrollo morfológico en el número de brotes, altura de brote, numero de brotes formados en el ex plante, porcentaje de contaminación y número de hojas, para así obtener un mejor resultado para desarrollar el protocolo de propagación in vitro del cultivo de mora sin espina.

La mora de castilla (*Rubus glaucus benth*) es una especie que se ha convertido en uno de los productos más apetecibles en los centros de producción agrícola nacionales gracias a su alto contenido de propiedades proteínicas, medicinales y potencial económico por lo que le ha permitido tener una gran aceptabilidad en los mercados nacionales e internacionales, a pesar del gran potencial que tiene la mora en los mercados su propagación se lo realiza vegetativamente en Ecuador que utilizan material que no es considerado como elite para su propagación y sin las normas de calidad fisiológicas, sanitaria ni genéticas siendo propensas a contraer diferentes tipos de enfermedades y plagas en su proceso de propagación vegetativa.

Las hormonas de crecimiento cumplen distintas funciones en el desarrollo morfológico y fisiológico de las plantas para su desarrollo, la auxina estimulan el alargamiento celular y división celular y la formación de raíces, brotes, regula el crecimiento vegetal, las citoquininas estas promueven al desarrollo de yemas laterales, formación y crecimiento de tallos , retardan la senescencia, inhibe el desarrollo de raíces adventicias, y promueven a la germinación, las giberelinas estas se muestran en la reducción del crecimiento pero también se manifiesta en estímulo de producción de flores.

Con la aplicación de las diferentes hormonas de crecimiento, el objetivo para los diferentes productores es obtener un mejor resultado y conocimiento de cuál de estas es la más eficaz para poder realizar una correcta propagación in vitro del cultivo de mora sin espina para obtener una producción libre de plagas y enfermedades que afectan al cultivo y su producción.

3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La mora de castilla (*Rubus glaucus benth*) o sin espinas también conocida a nivel mundial como la mora azul, es una de las especies de la clase *Rubus* más distinguido y cultivadas en toda Sudamérica. El rendimiento de *Rubus glaucus* es más sustancioso en minerales y vitaminas siendo muy apetecido por sus peculiaridades nutricionales y medicinales lo que le ha puesto en una gran aceptabilidad y competencias en los mercados.

La mora de castilla con espina (*Rubus glaucus*) es una planta rastrera, arbustiva y perenne que está formada por varias macollas y espinas, en sus tallos, lo cual estas características exigen un trabajo mayor a lo que se refiere en poda, control de crecimiento en las ramas y en el sistema de tutorado es mucho más complejo que otras variedades.

La multiplicación de la planta de mora de castilla va en aumento debido a la producción de fruta. A pesar de esto, tiene grandes limitaciones en cuanto a su propagación vegetativa ya que tradicionalmente se hace por acodos o estacas provocando el incremento de la introducción de plagas y enfermedades a la planta, además este tipo de propagación no permite tener un buen enraizamiento lo que baja la producción y calidad del fruto, presentando pérdidas económicas para los agricultores.

Para eludir estos tipos de inconvenientes en las técnicas de cultivo de los tejidos vegetales o de cultivo *in vitro* ha sido desarrollada con el fin de transferir de forma abundante clones con diferentes características de ser libres de patógenos o enfermedades que existen. La propagación se la realiza a partir de un esqueje vegetal o explante, garantizando su calidad y paridad de los nuevos clones que pueden ser comercializados en diferentes centros de comercialización, produciendo grandes ingresos económicos para quien desarrolla este tipo de multiplicación.

Ante la necesidad que existe de aumentar la reproducción del (*Rubus glaucus benth*), se propone desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* que reduzcan y asimilen el uso de plantas adquiridas en los campos, y permitan obtener plantas exentas de enfermedades y de mejor calidad, incluso que permitan la reducción de los costos de productividad por planta, por lo cual es necesario proliferar los índices de multiplicación y reducir los costos de los medios de cultivo. Tomando en cuenta los diferentes factores, se puede manifestar que la forma de reproducción más adecuada será el cultivo *in vitro*.

4. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

Los principales beneficiarios con la ejecución de este proyecto fueron los estudiantes del área de Agronomía ya que con este nuevo método de propagación in vitro se puede evitar plagas y enfermedades que se presenten en el cultivo y así los estudiantes pudieron ampliar sus conocimientos.

Este proyecto beneficio indirectamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi, puesto con los nuevos métodos que muestran los estudiantes de Agronomía como es la clonación de plantas en un medio de cultivo in vitro beneficia a los agricultores en general ya que el cultivo está libre de plagas y enfermedades.

5. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El género *Rubus* es sin duda uno de los más diversos en cuanto a sus características morfológicas y genéticas. Hay una diversidad en especies silvestres, y en las especies que son cultivadas son muy apreciadas por sus frutos comestibles a nivel nacional e internacional.

A pesar del gran potencial que tiene la mora en los mercados, su propagación se hace vegetativamente en Ecuador, utilizando materiales no considerados como elite, en su mayoría tanto en productores como vi veristas propagan la mora si normas de calidad fisiológica, sanitarias ni genéticas.

En la provincia de Tungurahua los agricultores buscan cultivar plantas certificadas, libre de plagas y enfermedades para de una u otra forma puedan entregar su producto de buena calidad y de gran cantidad de producción, es por esta razón que muchas de las empresas o instituciones privadas realizan propagación in vitro de mora de castilla para garantizar la producción necesaria de los agricultores y así evitando destrucciones a largo plazo.

En este contexto, el cultivo de tejidos o micropropagación in vitro es una de las técnicas más practicadas que contribuye a superar estas limitaciones, como también, es una técnica de multiplicación masiva de individuos de las especies frutales como la mora, libre de plagas, enfermedades y virus en un espacio reducido y manteniendo condiciones ambientales controladas.

¿Qué efecto tiene la aplicación de la propagación del cultivo de mora sin espinas que se realiza vegetativamente en el Ecuador?

6. OBJETIVOS

Objetivo General

- Desarrollar un protocolo de propagación in vitro de mora sin espinas (*Rubus glaucus benth*).

Objetivos Específicos

- Identificar el ex plante de partida ideal para ser introducido al laboratorio.
- Analizar las condiciones adecuadas para la esterilización del material de partida.
- Determinar el medio de cultivo adecuado para la multiplicación in vitro de mora, utilizando diferentes tipos de hormonas de crecimiento.

7. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN DE LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

Tabla1. Actividades y sistema de tareas en relación de los objetivos planteados

OBJETIVOS	ACTIVIDADES	RESULTADOS	VERIFICACIÓN
- Identificar el ex plante de partida ideal para ser introducido al laboratorio.	- Toma de variables de la planta. - Visita a plantaciones de mora. -Recolección del material vegetal en campo.	-Desarrollo del ex plante en el laboratorio	- Libreta de campo. -Registros Fotográficos.
- Analizar las condiciones adecuadas para la esterilización del material de partida.	-Realizar las esterilizaciones con alcohol y con hipoclorito de sodio donde se elimina todo tipo de patógenos.	-Porcentaje de contaminación.	- Libreta de campo. -Registros Fotográficos.
- Determinar el medio de cultivo adecuado para la multiplicación in vitro de mora, utilizando diferentes tipos de hormonas de crecimiento.	-Multiplicar el material vegetal introducido al laboratorio. -Colocar los ex plantas en medios de cultivo con diferentes hormonas. -El trabajo se lo realizara en cabina de flujo laminar.	-formación de callo organogénico. -Número de brotes por ex plante. -Longitud del brote. -Número de hojas por brote.	- Libreta de campo. -Cinta métrica -Registros Fotográficos.

Elaborado por: Carlos Chacón, Oscar Calapiña (2020)

8. FUNDAMENTACION CIENTIFICA TECNICA

8.1 Origen de la mora de castilla

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) perteneciente a la familia Rosácea, esta fue descubierta por Hartw y descrita por Benth en el año 1840. Originariamente es de las zonas tropicales más altas de América latina principalmente en los países de Ecuador, Colombia, Panamá, Guatemala, Honduras, salvador y México, el género *Rubus* acapara una gran cantidad de especies silvestres y no silvestres en el reino vegetal entre estas tenemos las más conocidas como son: *Ideaus (frambuesa)*, *occidentalis*, *folius (zarzamora)* y *occidentalis (frambuesa negra silvestre)*, las cuales son cultivadas en las zonas más templadas. (Guerrón Mallamas & Espinosa Chuquín, 2014)

En el reino vegetal el género *Rubus* tiene una gran cantidad de especies que se encuentran dispersas en casi todo el mundo excepto en lugares y áreas desérticas donde su desarrollo morfológico no se da adecuadamente, los Estados Unidos en 1840 empezó a realizar diferentes trabajos para obtener mejores variedades con características mejoradas morfológicas y fisiológicas, posteriormente a este trabajo se empezó a realizar diferentes y nuevas modificaciones de mora de castilla en las zonas templadas donde se encuentran unas 500 especies. (Rodríguez Vazquez., 2014).

Esta fruta es autóctona de los Andes Ecuatorianos (*Rubus glaucus benth*) entre otros países tropicales este fruto ha llamado la atención de los agricultores, en distintos lugares del país, como: Ambato, Quito, Otavalo y Ibarra, donde se vienen cultivando una limitada escala comercial desde aproximadamente 30 años, se reporta que *R. glaucus* ha sido descubierta creciendo cultivada o silvestre en altitudes de 2500 y 3000msnm de las serranías ecuatoriana. La mora de Castilla se ha convertido en el cultivo que más se ha incrementado considerablemente en los últimos tiempos en el país debido a la alta demanda de consumo tanto agroindustrial de alimentos como consumo humano, como para su exportación nacional e internacionalmente, de esta forma el cultivo de este fruto se ha convertido en una de las alternativas de producción que genera ingresos para los grandes y pequeños productores que se dedican a la producción de este fruto tan apetecible. (Cárdenas Castillo, 2013)

8.2 Mora de castilla con espina

La mora de castilla con espina es una planta perenne de forma arbustiva es rastrera y forman diferentes y varias macollas, las cuales con estas características exigen un trabajo mucho más grande en lo que es de poda control de crecimiento en las ramas y el sistema de tutorado es mucho más complejo. (Gutierrez A, 2014)

8.2.1 Sistema de propagación

Habitualmente la propagación de la mora de castilla con espina se la recomienda que sea de manera asexual ya que se obtienen un mejor rendimiento en resultados, la reproducción sexual no es muy conveniente ya que este tipo de reproducción no tienen tanta eficiencia ya que las semillas a germinar no lo hacen por completo y las plántulas las cuales si logran crecer su desarrollo es mucho más lento, pero las dos maneras de reproducción tiene propensidad a tener plagas y enfermedades que compliquen su desarrollo. (Diana Sulay Conteron Morales, 2016)

8.2.2 Tutoreo

La mora de castilla con espina exige un tutoreo muy complejo ya que por ser una planta de rastrera acumula muchas ramas al piso por las cuales se debe realizar el tutoreo para favoreces la aireación y las labores culturales. (Calero V. , 2010)

8.2.3 Podas

La mora sin espina requiere muchas podas ya que existen varias ramas que necesitan ser eliminadas como las ramas secas, cruzadas, chupones y las que tengan plagas y enfermedades, pero existe problemas al realizar las podas ya que constan de muchas espinas y esto no permite el fácil acceso a la poda y crea problemas como mala poda y eliminación de ramas productivas y principales, esta poda se la debe realizar cada 20 a 25 días para tener un cultivo más tecnificado y productivo. (Salinas, 2014)

8.2.4 Plagas y enfermedades

La mora con espina es muy propensa a contraer plagas y enfermedad en su estado de desarrollo o crecimiento por lo cual puede llegar generar grandes pérdidas económicas, las

plagas más comunes y enfermedades son araña roja (*Tetranychus urticae*), pulgón o áfido (*aphis spp*), trips (*Trips spp*) las enfermedades: mildiu veloso (*Peronospora sp*), muerte descendente (*Verticillun sp.*), podruccion del fruto (*Botrytis cinerea*).

8.2.5 Duración del cultivo

La mora sin espina tiene a producir a los 7 o 8 meses desde su siembra o trasplante la cual tiene una durabilidad de producción de 10 años dependiendo los manejos y cuidados que se le dé a la plantación (Salinas, 2014)

8.3 Situación de cultivo en el Ecuador

8.3.1 Cultivo de mora en el Ecuador

El cultivo de mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*) en el Ecuador se ha ido incrementando considerablemente en los últimos años tanto para su consumo fresco y el industrializado como para su exportación internacional con esta se constituye a una nueva alternativa de producción que genera ingresos para los productores grandes y pequeños que se dedican a este cultivo.

8.3.2 Superficie Cultivada

El Ecuador en el censo realizado en el año 2000 se reportó que el cultivo de mora de castilla engloba aproximadamente 4046 ha en diferentes monocultivos distribuidas en 10909 UPAS (unidad de producción agropecuaria) con u aproximado de producción de 10283 tm por censo anualmente y 1201 ha en cultivo asociado, que se encuentran distribuidas en 3637 UPAs. Que llega a un total de producción de 1211 toneladas por año. (Morales, Sulay, & Inlago Bautista, 2016)

8.3.3 Importancia Económica

- Desde la década de 1990 los cultivos de mora *Rubus Glaucus Benth ha* logrado adquirir gran importancia económica debido a:
- El cultivo se adapta adecuadamente al clima frio templado moderado.
- Su incremento al consumo del fruto fresco.
- Su gran aceptabilidad en las agroindustrias.
- Por lo preciosos que logran alcanzar en los mercados nacionales e internacionales.

8.3.4 Beneficios de su consumo de mora

La mora de castilla contiene una actividad anti oxidante cuatro veces más superior que la que hasta la actualidad se creí que tenía un mayor porcentaje de anti oxidantes como es la frutilla.

(Morales, Sulay, & Inlago Bautista, 2016) mencionan a través de (Calero, 2010) que entre las propiedades más nutricionales que posee la mora es la vitamina C que posee 840 mg de vitamina C y fibra por cada 100g de fruta que se consuma, la capacidad antioxidante es de 193 mg es más grande que la que posee la frutilla, la mora de castilla sin duda alguna tiene muchas utilidades como es el ayudar a prevenir infecciones y alteraciones en la pigmentación de la piel, las semillas de la mora presentan un alto contenido de aceites linoleicos; oleicos que intervienen y previenen enfermedades del corazón y cáncer y es utilizado también para dietas por su bajo contenido de calorías, posee pectina soluble que ayuda a la reducción de niveles de colesterol en la sangre y esto le ayudado a ser una fruta muy útil para la prevención y tratamientos circulares.

8.4 Composición nutricional de la mora

De acuerdo a Flores 1979 citado por (Ponoluisa & Estuardo, 2013) menciona que las moras son unas frutas con bajo valor calórico por su escaso aporte de carbohidratos, sin embargo son muy nutritivas en vitamina C, contribuyen con fibra, potasio, hierro, y calcio (estos dos últimos son de menor calidad que de los de origen animal), taninos (sustancias con acción astringente) con diversos ácidos orgánicos.

Esta se caracteriza por su contenido de pigmentación naturales como las antocianos que son sustancias con acción antioxidante que le dan el color a la mora y conjunto con el ácido oxálico son responsables de su sabor, es decir que previenen el desarrollo de algunas enfermedades y diferentes tipos de cáncer, poseen también fibra como es la pectina, a continuación, tenemos la composición nutricional de la mora.

Tabla 2. Composición nutricional de la mora

Factor Nutricional	Valor	Unidad
Valor calórico	35,1	Kcal
Glúcidos	6	G
Fibra	9	G
Provitamina A	0,00029	Mg
Vitamina C	18	Mg
Vitamina E	13,3	Mg
Potasio	210	Mg

Fuente: (Ponoluisa & Estuardo, 2013)

8.5 Descripción de la planta de mora

La mora de castilla (*Rubus glaucus*) es un semi arbusto que se lo puede encontrar de manera silvestre, las diferentes variedades que aún no han podido ser identificadas son originarias de climas fríos de la Cordillera de los Andes Ecuatorianos y Colombianos y se ha esparcido por los diferentes lugares de América Latina, el género *Rubus* es establecido como uno de los géneros con mayor variedad genética del reino vegetal, existen un aproximado de 500 especies de este género de mora y frambuesa las cuales siendo 300 especies de mora aproximadamente 9 de ellas tiene un valor comercial especialmente en el género *Rubus*.

La mora de castilla sin espina es un cultivo que recientemente fue introducido el cual se le ha categorizado como *R. glaucus* ya que toda su estructura vegetativa y reproductiva llegan a concordar con la acepción de la presencia de espinas, y puede ser diferenciada por su alta capacidad de producción de frutos que se da por la mayor cantidad de ramas productoras. (Moreno Guerrero, Andrade Cuví, A, Túqueres Ushca, & Concellón, 2016)

La mora es una antofita dicotiledónea que es perteneciente al orden de rosales con un aproximado de 20 especies silvestres que se encuentran reportadas dentro del territorio ecuatoriano es un arbusto perenne de un crecimiento desordenado, rastrero, cuyas hojas son de un color verdoso con diferentes números de folíolos variables que generalmente son lanceolados y con el envés pubescente.

La mora de castilla es semi erecta y está conformada por varios tallos un diámetro de 1 y 2 cm con una longitud de 3 a 4 m y un aproximado de 3 metros de altura, sus hojas disponen de

bordes aserrados, miden de 3 a 5cm de largo y no tienen espinas en la parte inferior, sus hojas y tallos están recubiertos de un polvo blanquecino, en la base de la planta se localiza la corona donde se dormán los tallos. (Alonso & Jiménez, 2011)

Se ha estimado que su sistema radicular puede llegar a una profundidad de un metro dependiendo del tipo de suelo y subsuelo, de adjunta también la descripción de sus flores blancas las mismas que se puede prescribir en racimos en las puntas de las ramas o en su totalidad, estas flores poseen 5 sépalos y 5 pétalos, esta variedad posee una cantidad de sólidos solubles totales con un óptimo tamaño de fruto y productividad la producción de la planta es continua aunque existe épocas donde existe mayor producción con unos intervalos de 5 a 6 meses. (Ovideo & Andrés., 2017)

Los tallos tienen una longitud variable estas se pueden ramificar y emiten constantemente sus brotes en la base, los aguijones en esta variedad son rudimentario en comparación con su predecesor con espina, esta posee mayor número de ramas productoras y una macolla miento entre el 15% y 20% superior a la mora tradicional con espina. (Martinez & Alfonso., 2017)

La fruta de la mora de castilla es esférica, su tamaño es de diverso tamaño entre 2 a 4 cm de longitud, con un diámetro aproximadamente de 20 cm. Su color es verde cuando se está desarrollando cuando llega a su etapa de madurez posee un color muy variado entre el púrpura claro y oscuro. la planta empieza a realizar su fructificación a los 8 meses después de haber sido trasplantada dependiendo de los manejos y cuidados que se le otorgue a la plantación con sus respectivas labores culturales este posee un periodo de 10 años o más de producción dependiendo sus cuidados. (Rodríguez & Elizabeth, 2014)

La baya de la mora de castilla está formada por diminutas drupas adheridas a una receptáculo que son entre (70 y 100) dentro de cada drupa se encuentra una semilla, cuando llegan a la maduración tiene un color que va de rojo a rojo púrpura o rojo oscuro, el peso del fruto tiene un promedio de 3 a 5 gramos la consistencia que posee es dura y su sabor es agridulce tierno Ha dulce cuando está maduro. (Angulo Catro, 2012)

De acuerdo con Martínez et al., 2007 citado por (Ovideo & Andrés., 2017), la clasificación botánica de la mora es la siguiente

Tabla 3. Clasificación botánica de la mora

Clasificación	Nombre
Reino	Vegetal
Clase	Angiospermae
Subclase	Dicotyledoneae
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Género	<i>Rubus</i>
Otros nombres	Mora de castilla, zarzamora
Especie	<i>glaucus</i>
Nombre científico	<i>Rubus glaucus</i>

Fuente: (Ovideo & Andrés., 2017)

8.6 Descripción botánica y agronómica de la mora

La mora es una planta antofita dicotiledónea que corresponde al orden rosales con más de 20 especies silvestres en las tierras ecuatorianas esta planta tiene un crecimiento desordenado. (Freire Salazar, 2012)

8.6.1 Botánica de la mora

Es una planta vegetal perenne, arbustiva y semi erecta conformada por varios tallos espinosos, esta puede llegar a tener una altura aproximada de hasta 3 metros, sus hojas tienen folios, ovoides de 3 a 5 cm de largo. (Lligüín & Manuel, 2015)

8.6.2 Raíz

La planta de mora presenta una raíz fasciculada en la cual las raíces primarias se desarrollan o se forman a partir de la corona de la planta que es la base de la planta y también da origen a un extenso número de tallos. Estas raíces se dividen en los primeros 30 cm o 50 cm de profundidad para que se puede realizar esta acción depende mucho del tipo de suelo, disponibilidad de nutrientes, humedad y temperatura, estas proporcionan el sostén a la planta. Una diferente característica muy importante es la de las raíces junto con los tallos subterráneos, que presentan yemas que favorecen y ayudan a la reproducción asexual. (Freire Salazar, 2012)

8.6.3 Tallo

Los tallos tienen a formar macollos, tienen un color crema y poseen espinas, aunque estas se presentan más leves en la variedad de mora sin espina. Los tallos crecen y se desarrollan durante el primer año y entonces florecen y producen frutos (desarrollo bianual) en muchas especies los tallos con medida que pasa el tiempo van creciendo y se arquean hasta llegar al suelo en donde elaboran raíces en los ápices y entrenudos, donde surge una propagación vegetativa natural semejante a los acodos. Las coronas se desarrollan en las bases de las plantas y es desde aquí donde se forman los tallos primarios del cual se desprenden ramas primarias, secundarias y terciarias y de las mismas se crean las raíces. (Lligüín & Remigio, 2015)

8.6.4 Ramas

En la planta de mora se puede lograr distinguir la existencia de tres tipos de ramas que son: ramas látigos, ramas vegetativas, y ramas productivas. Las primeras poseen un diámetro y hojas más pequeñas; las ramas vegetativas son mucho más gruesas por lo habitual poseen más espinas y tienen hojas cerradas en sus puntas; las ramas productivas tienen un porte intermedio entre los látigos y las ramas vegetativas y se identifican con facilidad principalmente porque las hojas se encuentran abiertas en sus puntas y por su crecimiento vertical. (Lligüín & Manuel, 2015)

8.6.5 Hojas

Las hojas de la mora sin espina son compuestas, trifoliadas, de peciolo blancuzco, cilíndrico y recubierto de espinas que también se encuentran nervios, en la cara inferior de la lámina, los folíolos son ovoides, de 5 a 12 cm de largo son acuminados y aserrados el haz es verde oscuro y el envés blanquecino. (Almachi Chiluisa & Yesenia., 2017)

8.6.6 Flores

Sus flores son compuestas y actinomorfas, típicamente peregrinas son de color blanco de 2.0 a 2.5 cm de diámetro y se encuentran en racimos en las puntas de las ramas, en ciertas ocasiones en toda la rama, tienen 5 sépalos. Poseen muchos estambres y carpelos libres que están unidos al receptáculo, cada carpelo está complementado de 1 ovario, 2 óvulos y 1 pistilo largo. Las ramas florecen en los racimos terminales. (Almachi Chiluisa & Yesenia., 2017)

8.7 Fenología del cultivo de mora sin espina

La mora sin espina llega a presentar tres etapas de desarrollo. La primera, es en la cual se adquieren las plantas nuevas que se reproducen de forma sexual o asexual. La segunda es la de desarrollo y crecimiento vegetativo donde se conforma la planta y la tercera y última etapa que es la productiva que se inicia a los 8 años después de haber realizado el trasplante y se mantiene constante durante varios años esto va dependiendo el método de propagación que se efectuó la obtención de una nueva planta puede tomar de 10 a 30 días desde el instante que se realiza la propagación asexual. (Martinez & Alfonso., 2017)

8.8 Requerimientos climáticos

8.8.1 Clima

Según Rosero F. (2005). Citado por (Espin Chico & Cecilia., 2013) manifiesta que la mora se adapta a una gran faja de climática y es posible cultivar desde los 1500 a 3200 msnm a esta altitud la temperatura sería de 5 a 22 °C. Las temperaturas que favorecen al cultivo son las que varían entre 10 y 14°C la mora es muy susceptible a las heladas. En cuanto a la precipitación esta requiere de 1200 a 1500 mm anuales, y una humedad relativa del 80% una abundante luminosidad, los días nublados y sombrosos son los que no favorecen a la polinización y favorecen a enfermedades como la Botritis.

8.8.2 Suelo

La mora de castilla es muy exigente en los tipos de suelos., esta prefiere los suelos que contengan un alto contenido de material orgánico y con un buen drenaje y al mismo tiempo debe tener la capacidad de poder retener el agua. Los suelos de tipo franco son los más recomendados. El pH debe variar entre 5.2, siendo el 7.7 el óptimo para el suelo indicado debe tener o conservar una conexión de Potasio (K): Magnesio (Mg): Calcio (Ca): ya que en afinidad con el Boro (B) son responsables de una mayor o menor resistencia a las enfermedades. (Espin Chico & Cecilia., 2013)

8.8.3 Temperatura

Clima relativamente fresco y soleado con una temperatura promedio de 25 °C y una temperatura baja promedio de 6°C.

8.8.4 Altitud

Para la obtención de un perfecto y progresivo desarrollo de la mora esta se la debe cultivar en los 1200 y 2000 msnm, aunque puede tolerar un amplio rango de altitudes.

8.8.5 Precipitación pluvial

La precipitación adecuada para este cultivo mora oscila entre 1500 y 2500 mm al año bien distribuidas.

8.8.6 Humedad relativa

La humedad relativa adecuada para el cultivo de mora va desde el 80% al 90%.

8.9 Propagación

La mora de castilla se propaga de forma asexual como sexual. Sin embargo, existen nuevas técnicas de propagación como es principalmente de forma asexual, dentro de las cual existen los siguientes tipos de propagación. (Espin Chico & Cecilia., 2013)

8.9.1 Estacas

La propagación por estaca consiste en cortar de tallos de 35cm de longitud de talos vigorosos, con un diámetro aproximado de 1 cm y debe tener entre 3 a 4 yemas. La estaca es directamente plantada en una funda con sustrato, utilizando hormonas para enraizamiento. Se obtendrá la planta lista para el trasplante en 60 días aproximadamente. (Lligüín & Remigio, 2015)

8.9.2 Acodo

Este se trata del mejor método para la obtención de planta de mayor intensidad, consiste en que cierta proporción del tallo de la planta madre se enraíce sin que sea separada de la misma una vez que el tallo se haya enraizado se lo separa de la planta madre. (Casco Olivo, 2013)

8.9.3 Acodo rastrero

Este se lo realiza en de tallos largos, que tengan unas buenas características, estas se tienden en el suelo donde se procede a enterrar porciones del tallo cada 25 cm hasta cubrir toda la

rama. Para pueda favorecer al desarrollo de raíces. De una parte, de la rama se pueden adquirir de tres a cuatro acodos. A los 3 meses estas están listas para ser sembradas como nuevas plantas. (Casco Olivo, 2013)

8.9.4 Acodo de punta

Se realiza a partir de una rama dándole una forma arqueada y enterrar la punta de la rama aproximadamente 10cm en el suelo esto se lo puede realizar en fundas con sustrato o en el mismo sitio nacen raíces de la punta enterrada y los de 30 días de este proceso se procede a realizar un corte a 50 cm del suelo, obteniendo así una nueva planta para ser trasplantada al lugar definitivo donde se vaya a colocar la planta. (Casco Olivo, 2013)

8.9.5 Propagación por raíz o fragmentos de tallos subterráneos

Para realizar este tipo de propagación hay que tomar en cuenta los fragmentos de tallo subterráneo, de plantas seleccionadas que serán divididos en secciones de 10 a 15 centímetros de longitud, 1 a 1,5 centímetros de diámetro y con 2 a 3 yemas. Estas secciones se siembran en fundas con sustrato, en 45 a 60 días se obtendrán para el trasplante. (Guerrón Mallamas & Espinosa Chuquín, 2014)

8.10 Plagas del cultivo de mora sin espinas

La perla de la tierra (*Eurhizococcus colobianus*): esta plaga se alimenta de la sabia elaborada que produce la planta estos son del orden Homóptero, las cuales tienen mayor disposición en suelos ácidos. Estas formas agallas y verrugas al momento que estos absorben la sabia en su estado ninfa por medio de su aparato bucal que está adaptado para este proceso. Es allí donde también se suele producir y formar nubosidades o algunos quistes en la raíz donde estos bloquean el paso del agua y de los nutrientes en las plantas y suspenden su crecimiento y desarrollo. La planta que se encuentra enferma produce pocos tallos, disminuye su floración, no se desarrollan los frutos o suelen quedar en tamaños pequeños y secos. (De Bogotá, 2015)

Trips (*Frankliniella spp*): se trata de una plaga las cuales sus larvas llegan a producir daños ya que se alimentan de los tejidos de las plantas, estos son insectos muy pequeños que logran sobrepasar los 2 mm, este presenta un color amarillento y negrozco; estas plagas succionan su alimento de hojas y frutos, estos llegan a ocasionar amarillamientos, y en sus frutas presenta raspaduras. Las altas poblaciones llegarán a inducir grandes pérdidas de las flores

prematuramente; estos suelen ser transmisores de virus que llegan a afectar la producción. (Jarrín Cerda, 2017)

Barredor de tallo (*Zascelis sp*): Esta plaga se llega a desimanan rápidamente y llegar a causar graves daños y llega a provocar la muerte de todas las plantas. La larva que llega a producir esta plaga es huésped en la corana de la raíz y la base de tallo de la planta. Las consecuencias de los ataques que realiza son muy altas, la planta llega a presentar engrosamiento más de lo habitual, agallas y el tallo es corchoso. La planta inhibe su crecimiento, no emite gran cantidad de tallos y la producción de los frutos disminuye constantemente. (De Bogotá, 2015)

Ácaros – Arañita roja (*Tetranychus sp*): Los ácaros suelen ser dañinos en la planta en su estado de ninfas como en adultos. Estos se llegan a alojar y localizar en el envés de las distintas hojas y sus síntomas de daño pueden notarse en los frutos, los cuales adquieren un color rojo oxido. Las hojas llegan a tornarse pálidas y arrugadas; cuando existe ataques fuertes estas se cubren con telarañas las cuales llegan a dificultar el control ya que sirven de protección. (Jarrín Cerda, 2017)

Burrita de la virgen (*Compsus sp*): Esta es considerado una plaga que llega a tener doble acción que es conocida como picudo de la mora. Esta larva causa muchos daños en las raíces y el adulto en las hojas. El estado de larva de este acaro es el más dañino. Al hacer eclosiones estas caen al suelo y se cubren rápidamente para alimentarse y no morir; inicialmente su alimentación lo hace de las raicillas y los pelos absorbentes y posteriormente se alimentan de las raíces más gruesas de la planta. Los adultos se suelen alimentan de los bordes de las hojas, dejándolas con un aspecto aserrado. Pueden producir graves defoliaciones en plantas jóvenes. El picudo de a mora es de un color blanquizco hueso, la hembra llega a medir de 1,2 cm el macho es más pequeño mide de 8 milímetros al 1 centímetro. (De Bogotá, 2015)

8.11 Enfermedades de la mora sin espinas

Verticillium sp: Esta enfermedad se caracteriza por encontrarse en suelos o campos agrícolas y forestales, puede ser causado por fenómenos naturales o actividades humanas ya que esto involucra transporte para partículas en el suelo. Una vez que el hongo ha caído en el cultivo es difícil erradicarlo ya que tienen un alto rango de hospedaje. Las plantas que han sido afectadas presentan coloraciones marrones los bordes y entre las venas de los folios. (Jarrín Cerda, 2017)

Pudrición del fruto (*Botrytis cinera*): Es un hongo parasito facultativo el cual tiene una gran cantidad de hospederos. Los síntomas son manifestados principalmente en las estructuras reproductivas de la planta. Esto puede provocar una gran pérdida en el cultivo. Las flores al encontrarse en presencia de esta enfermedad presentan una coloración parda en los pétalos y os tallos tienden a necrosarse. (De Bogotá, 2015)

Antracnosis (*Colletotrichum sp*): El antracnosis provoca de manera progresiva descendiente la muerte de os brotes y ramas de la planta dando como resultado frutos muertos. Se presentan primermente en os tallos y las ramas, en donde se pueden observar la aparición de manchas ovaladas de un color morado que los va cubriendo totalmente. Al pasar un tiempo las lesiones provocadas van tornandose de un color negro y tienden a sacarse: en ele interior del tallo se observa una muerte evidente de tejidos. El hongo normalmente penetra por los bordes tiernos de la ram, lo cual prvooca un ennergrecimiento y las hojas que se encuentran en formacion se marchitan, amarillan y mueren. (Jarrín Cerda, 2017)

Mildéu vellosa (*Peronospora sp*): Está enfermedad especialmente ataca a las hojas, tallo, pedúnculos y frutos. En los tallos se pueden observar lesiones con una coloración blanquecina sobre las cuales se generan vellosidades. El pedúnculo se seca de arriba hacia abajo, las flores se tornan de un color amarillento hasta que finalmente se caen, los frutos presentan desarrollo irregular, mala maduración y tienen una gran pérdida de turgencia y de brillo. (De Bogotá, 2015)

Mildéu polvoso (*Oidium sp, Sphaeroteca sp*): Esta enfermedad ataca de manera directa las yemas y frutos de la planta, en especial afecta principalmente las hojas. Su ataque se evidencia cuando se produce un arrugamiento en el haz de la hoja, luego aparecen manchas cloróticas en el mismo sitio y en el envés se genera un polvo blanco. Si existen ataques mayores puede provocar deformaciones en el fruto. (Jarrín Cerda, 2017)

8.12 Cultivo in vitro

El cultivo in vitro de plantas se define como un conjunto de técnicas que permiten que el cultivo de las células y tejidos vegetales en condiciones axénicas y en el aprovechamiento de su toti potencia, así como de su aptitud para la variación y a capacidad de modificación genética. (Alonso & Jiménez, 2011)

Cultivo in vitro o de células y tejidos es una fuente alternativa para la producción de valiosos compuestos a partir de plantas. El cultivo de células indiferenciadas ha sido objeto de numerosas investigaciones, sin embargo, un gran interés ha despertado en el cultivo de raíces y órganos durante los últimos años. (Alonso & Jiménez, 2011)

8.13 Etapas de propagación in vitro

8.13.1 Primera Etapa

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante el periodo de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. (Castillo, 2004)

8.13.2 Selección del explante

La selección del explante se realiza con el objetivo de que la planta madre se encuentre libre de plagas y enfermedades, a la vez hay que tomar mucho en cuenta la edad de la planta, en lo cual juega rol importante ya que depende de eso se puede obtener un clon de buenas características y de un buen material genético. (Villalobos & Thrope, 1991)

8.13.3 Genotipo

La capacidad para regenerarse y de división celular es muy variada dentro de una misma especie. Las condiciones tienen mayor capacidad de regeneración que las monocotiledóneas. Una planta que se regenera fácilmente in vitro, se espera que se regenere de igual manera. (Castillo, 2004)

8.13.4 Edad de la planta

La edad de la planta juega un rol importante para la regeneración de un explante es inversamente proporcional a la edad del cultivo, es por ello que se tiende a utilizar material juvenil, embriones y semillas para regeneración in vitro. (Villalobos & Thrope, 1991)

8.14 Micropropagación

Tratando de conciliar principios anteriormente discutidos, se puede decir que cuando contagio con pontenciabilidad de diferenciación se incuban en condiciones favorables balance hormonal apropiado regeneran un nuevo individuo. (Villalobos & Thrope, 1991)

En la actualidad, se practica la micropropagación en especies ornamentales, pero recientemente en se lo está realizando especies leñosas, esta metodología ha llegado demostrar importantes ventajas en comparación con los diferentes sistemas convencionales utilizados en la propagación; las más comunes e importantes son

- El aumento veloz del número de plantas procedente por genotipo.
- Abreviación del tiempo de reproducción.
- Posibilidad de reproducir grandes cantidades de plantas en un ámbito espacioso, a menores costos y en tiempos económicos pequeños.
- Mejor control en la sanidad del material que se está realizando la propagación.
- Excelente comodidad para trasladar el material in vitro de una región a otra, con menos limitaciones aduaneras.
- Mejor posibilidad de una propagación rápida de una variedad la cual solo exista pocos individuos.

8.15 Cultivo de tejidos

Con el fin de obtener una propagación de forma rápida, a gran escala de plantas sanas, libres de bacterias y hongos; la micropropagación y el cultivo de meristemas, son excelentes opciones para la multiplicación del cultivo de mora de castilla. (Hernandez, 1999)

Los cultivos de los tejidos son métodos que consisten esencialmente en separar una porción de la planta (explante) y facilitar artificialmente todas las condiciones físicas e químicas apropiadas para que la célula expresen su potencial intrínseco o individuo. Es necesario además adoptar procedimiento de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana. (Szabados, 1991)

El laboratorio de cultivo de tejidos debe disponer de un área destinada al establecimiento, crecimiento y multiplicación de la planta producida; esta área es especialmente necesaria en

los laboratorios de investigación y desarrollo y en los de producción comercial. En la propagación in vitro de mora de castilla se recomienda el uso combinado de citoquininas y giberelinas para una mayor tasa de multiplicación indicando que se puede reducir la concentración de la citoquinina hasta 1 ppm, sin embargo, no llega a la fase de enraizamiento y adaptación al sustrato. (Hernandez, 1999)

8.16 Reguladores de crecimiento

Para que se efectuara un desarrollo óptimo de las diferentes especies vegetales en un cultivo in vitro se requiere de diferentes reguladores de crecimiento vegetal o artificial en los medios de cultivo. Estas fitohormonas son composiciones químicas que estimulan una reacción fisiológica. Entre los reguladores más esenciales se encuentran las auxinas, citoquininas y giberelinas. (Guamán Carrasco, 2018)

8.16.1 Las auxinas

Las auxinas se relacionan con el crecimiento de los tallos, también llamados apicales, influye en el enraizamiento y abscisión, las que más se utilizan en los laboratorios in vitro son: AIA (ácido indol 1-3 butírico), ANA (ácido naftalenacetico), AIA (ácido indolacetico) y por último el 2.4-D (ácido dilorofenoxiacetico). (Jordán, 2006)

8.16.2 Citoquininas

Las hormonas citoquininas están vinculadas con el proceso del fraccionamiento celular. Entre las más empleadas se encuentran: BAP (Bencilamino Purina), Kinetina y 2-ip (isopentenil-adenina). (Guamán Carrasco, 2018)

8.16.3 Giberelinas

Las giberelinas ayudan al crecimiento de los tallos, bueno esto se da ya que la hormona induce a la extensión de las células e incrementan la elasticidad de la pared celular. La giberelina es el primer ácido en ser descubierto, esta hormona aumenta la elongación de entrenudos y provocan un desarrollo de meristemos o yemas axilares. (Jordán, 2006)

8.17 Agentes gelificantes

El agar es considerada como uno de los agentes gelificantes más importantes, este tipo de agente gelificante es constituida de galactosa y anhidra galactosa parcialmente esterificada con ácido sulfúrico, produce una gelificación perceptible en concentraciones tan bajas como 0.04%. No es soluble en agua fría, pero se disuelve completamente en agua caliente, y la gelificación se inicia en la faja de 35 a 40°C, resultando un gel fuerte, claro y termorreversible que solo se licua si la temperatura llega a 85°C. (Pasquel, 2010)

El agar tiene toda clase de compuestos nutritivos para la planta como es el MS 4,3g/L, la sacarosa 30g/L, el inositol se encuentra a 3mg/L y el agar se necesita 4g/500ml donde cada uno de estos compuestos forman la parte del medio de cultivo, también además de estos compuestos ya mencionados se pueden aplicar hormonas de crecimiento como pueden ser las citoquininas (BAP), las auxinas (AIA) y las giberelinas (GA3) donde cada una de estos compuestos tienen una función en específico el agar puede estar formado por otros compuestos eso depende de la especie o variedad, en la que este propuesta el objetivo. (Gordo & Pacheco, 2012)

Sus propiedades gelificantes, la resistencia térmica de sus geles y la marcada diferencia entre sus temperaturas de gelificación se ha convertido en el material de soporte más ampliamente usado, pues provee el medio de un cultivo con una excelente humedad también sirve como soporte para el explante y es utilizado como gelrite o fitagel. (Pasquel, 2010)

8.18 Protocolo de desinfección

El principal objetivo es evitar la contaminación en el cultivo, para obtener un éxito en este proceso. En este proceso de vital importancia es el cual debe permitir suprimir los patógenos y microorganismos con el menor daño posible, mediante la desinfección superficial. No existe un protocolo en general para esta desinfección, es por esto por lo que se debe tener en cuenta la especie y el tipo de explante el cual se va a realizar a desinfección. (Vichuela, 2014)

8.19 Factores limitantes

8.19.1 Fenolización

Durante el cultivo in vitro, algunas plantas al sufrir heridas producen exudados de color marrón o negro, como producto de la liberación y oxidación de polifenoles y taninos, que

resultan en compuestos químicos que son tóxicos y frecuentemente afectan al crecimiento y desarrollo de las plantas, pudiendo ocasionar la muerte del explante. (Limaico Torres, 2018)

8.19.2 Contaminación

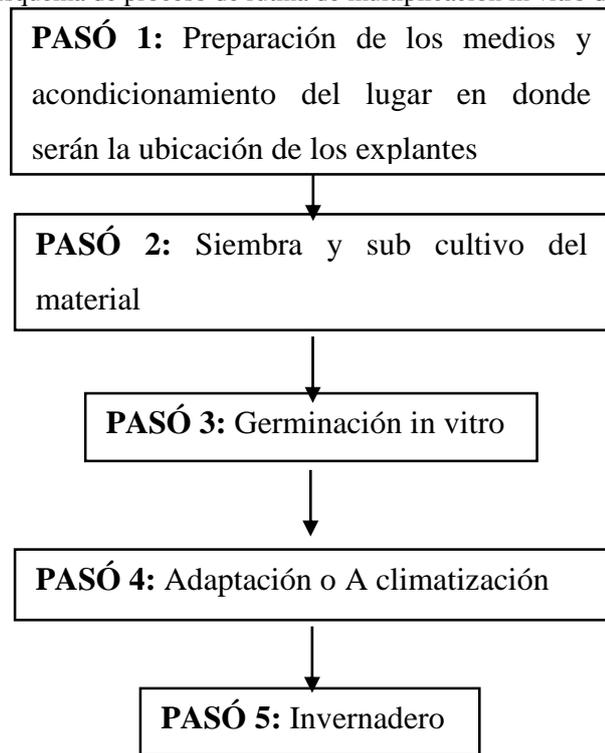
Existen cuatro factores de contaminación: el explante, el medio, el aire y el operador la más importante es el material vegetal se encuentre libre de plagas y enfermedades para así poder obtener un clon libre de contaminación. (Vichuela, 2014)

La contaminación puede presentarse por un inadecuado manejo del protocolo de desinfección, cuando es una contaminación exógena y al ser una contaminación endógena cuando se trata de contaminantes sistémicos. (Limaico Torres, 2018)

8.20 Requerimientos para un cultivo in vitro

Gracias a los altos conocimientos en fisiología vegetal, la propagación in vitro de plantas se ha desarrollado de una manera significativa en los recientes años, pero sin embargo para obtener unos buenos resultados se toma en cuenta el diseño y la organización del laboratorio de cultivos in vitro. Para el diseño de un laboratorio crucialmente depende su ubicación en los sectores donde se llevan a cabo las acciones correspondientes de cada fase, deberían ajustarse a las sucesiones en cuestión. (Sandra Sharry, 2009)

Figura 1. Esquema de proceso de rutina de multiplicación in vitro de plantas



Fuente: (Sandra Sharry, 2009)

8.21 Recipientes para el cultivo

Distintos recipientes de vidrio y de tamaño idóneo, es adecuado como recipiente de cultivo. Dado que durante el momento de descubrir el cultivo es donde la polución o contaminación se da con mayor reiteración, los diferentes tubos de cultivo varían entre (2,2 a 2,5 cm de diámetro y entre 11 y 15 cm de largo) se expone como el recipiente más conveniente para esta etapa o periodo, debido a que los explantes están especificados uno por tubo lo que permite reducir las pérdidas del material vegetativo y de los medios de cultivos. Durante la etapa de reproducción o multiplicación el uso de los frascos de vidrio de 250-300ml de capacidad, con boca ancha, que permiten insertar y cultivar distintos brotes en cada uno de ellos, pueden ser de gran beneficio. (Sandra Sharry, 2009)

9. PREGUNTAS CIENTIFICAS O HIPOTESIS

Ha: El protocolo que se desarrolló en base a la utilización de hormonas de crecimiento y la unión de elementos del medio de cultivo si permite el desarrollo vegetativo de la mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*) a partir de micro estacas.

Ho: El protocolo que se desarrolló en base a la utilización de hormonas de crecimiento y la unión de elementos del medio de cultivo no permite el desarrollo vegetativo de la mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*) a partir de micro estacas.

10. DISEÑO METODOLÓGICO

10.1 Ubicación y duración del proyecto

El proyecto se realizó en el Cantón Cevallos de la Provincia de Tungurahua en el barrio San Fernando en el laboratorio de biotecnología VITRO plantas. La investigación tuvo la duración de 100 días de trabajos en el laboratorio y 20 días del establecimiento del ensayo. Tiempo en el cual se evaluó el desarrollo vegetativo del cultivo de mora (*Rubus glaucus Benth*) con diferentes hormonas de crecimiento y la combinación de estas mismas.

10.2 Tipo de investigación

La investigación experimental se utilizó dentro de esta investigación ya que nos ayudó a desarrollar la experimentación en el laboratorio tomando algunas variables que nos facilitó comprender el trabajo, mientras tanto la investigación descriptiva nos posibilitó identificar las diferentes relaciones que existen entre las distintas variables obtenidas, y la investigación bibliografía fue un apoyo tomado de las diferentes investigaciones realizadas anteriormente para facilitar nuestra investigación bibliográfica.

10.2.1 Técnicas

Se utilizó la técnica observación en el laboratorio donde se procedió a realizar una toma de datos al concluir el proyecto que fue de vital importancia, para comprobar los efectos producidos por las hormonas de crecimiento, también se realizó la tabulación en Excel y posteriormente al análisis de los diferentes datos obtenidos mediante el análisis estadístico Infostat, para entender con mayor facilidad los resultados obtenidos y las diferencias de cada uno de los tratamientos.

10.3 Materiales y equipos

Tabla 4. Materiales y equipos que se utilizaron en la investigación

Materias	Equipos
Tijera de poda	Cámara de flujo
Agua	Autoclave
Fundas plásticas	Balanza analítica
Papel periódico	Plancha de calentamiento
Tubos de ensayo	Agitador magnético
Frascos de vidrio	PH - metro
Mecheros de alcohol	Microondas
Pinzas de desinfección	Mecheros
Bisturís	Refrigerador
Mangos de bisturí	Destilador de agua
Magetas autoclave	
Papel aluminio	
Hormonas (GA3, AIA, BAP)	
Computadora	
Lápices	
Regla	
Teléfono celular	
Cuaderno	
Calculadora	
Alcohol antiséptico	
Hipoclorito de sodio	
Alcohol industrial	

Elaborado por: Carlos Chacón, Oscar Calapiña (2020).

10.4 Condiciones meteorológicas

Las condiciones climáticas y meteorológicas son controladas como se puede observar en tabla 5.

Tabla 5. Condiciones meteorológicas controladas.

Parámetros	Promedios
Temperatura	17°C – 27°C
Humedad relativa	30% - 70%
Velocidad de aire	0.25 – 0.50 m/s
Sistema de aire acondicionado	0.25 m/s

Elaborado por: Carlos Chacón, Oscar Calapiña (2020).

10.5 Diseño experimental

El diseño experimental que se utilizó fue el diseño completamente al azar, con 7 tratamientos y 10 repeticiones utilizando la prueba de rangos múltiples de Tukey al 5%.

Tabla 6. Esquema de la fuente de variación y grados de libertad

Fuente de variación		Grados de libertad
Repetición	(r-1)	9
Tratamientos	(T-1)	6
Error	(r-1)(T-1)	54
Total		69

Elaborado por: Carlos Chacón, Oscar Calapiña (2020).

10.5.1 Esquema del experimento

A continuación, en la siguiente tabla 8 se presenta el esquema del experimento para el cultivo de mora sin espina donde se utilizaron 7 tratamientos, con 10 repeticiones.

Tabla 7. Manejo metodológico del ensayo.

Tratamientos y Dosis	Unidades	Repeticiones	Total
T1: Mora sin espina G 1ml/L	1	10	10
T2: Mora sin espina A 2ml/L	1	10	10
T3: Mora sin espina B+G 4ml/L, 2ml/L	1	10	10
T4: Mora sin espina G+A 1ml/L, 2ml/L	1	10	10
T5: Mora sin espina A+B 2ml/L, 4ml/L	1	10	10
T6: Mora sin espina B 4ml/L	1	10	10
T6: Mora sin espina Testigo	1	10	10
Total			70

Elaborado por: Carlos Chacón, Oscar Calapiña (2020).

10.6 Manejo metodológico del ensayo

10.6.1 Selección y preparación del material vegetal

El explante fue recolectado en la misma zona donde se encuentra ubicado el laboratorio, la recolección se realizó minuciosamente ubicando el mejor material vegetativo, que fueron tomadas de la parte media de la planta madre que debe ser saludable, estas deben tener una longitud aproximada de 30 cm cuyo número de yemas útiles varía entre 3 a 12 yemas estas deben estar libres de plagas y enfermedades y debe ser un material vegetativo joven ya que tiene mayor cantidad de células de división.

10.6.2 Área de lavado y desinfección

Se realizó la extracción de las hojas del material vegetativo teniendo mucho cuidado de no dañar las yemas ni al mismo material vegetativo se realizó un corte transversal de 1,5 cm a 2 cm aproximadamente, para la obtención del material de partida que fueron utilizadas, estas tuvieron un aproximado de 1 a 2 yemas no muy desarrolladas ni precoces, se tomó en cuenta que los primeros 5 cm de la parte inferior y superior del material vegetativo no son utilizados para obtener las micro estacas.

10.6.3 Establecimiento del cultivo aséptico

Una vez que se tomó el material vegetativo se realizó una agrupación de 8 micros estacas, sostenidas con una liga y antes de ingresarlos al medio de cultivo estos deben pasar por una serie de desinfecciones con diferentes químicos.

10.6.4 Primera desinfección

Se efectuó el primer lavado o la primera desinfección con una concentración de 70 % de hipoclorito de sodio (NaCl) y con el 30% de agua destilada, así dando un total de concentración del 100% de esta mezcla, este procedimiento tiene una duración de 5 minutos agitándolo continuamente.

10.6.5 Segunda desinfección

En la segunda desinfección se realizó la mezcla de alcohol industrial al 70% con el 30% de agua destilada dando una suma del 100% de este compuesto, de esta manera este procedimiento se ejecutó durante 10 minutos después de este lapso se lo preparo para llevarla a la cámara de flujo laminar.

10.7 Ingreso y desinfección de la cámara de flujo laminar

Se trasladó las micro estacas a la cámara de flujo laminar donde se realizó la segunda fase de desinfección, antes de esto se realizó la limpieza total de la cámara de flujo laminar con alcohol al 97 % de concentración y utilizando el papel de limpieza desechables, se desinfecto toda el área de trabajo donde se encontraban tres frascos con agua destilada, se realizó la desinfección previa de nuestras manos para trasladar las micro estacas con ayuda de una pinza previamente desinfectada con el mechero que se encontraba encendido y el alcohol que servía para desinfectar las pinzas, se trasladó las micro estacas hacia los 3 frascos donde se lo mantuvo por un lapso de 5, 10, 15, minutos en cada uno de los frascos con unos movimientos leves verticales continuamente para que recubra en su totalidad el material vegetal y así se cumple el protocolo de desinfección del material vegetativo.

10.8 Introducción del material in vitro

En la introducción del material in vitro se ejecutó un corte a los extremos del material vegetativo con ayuda de una pinza y un bisturí previamente desinfectados, esto se realizó debido que al momento de pasar el proceso de desinfección del material vegetativo tuvieron un daño en las partes inferiores y superiores, como una quemazón por lo cual se realizó el respectivo corte.

10.8.1 Siembra del explante en el medio de cultivo

Se cortaron todos los extremos de cada explante se procedió a introducirlos en el medio de cultivo, en cada medio de cultivo se introdujo un número de 3 a 4 explantes esto se lo realizó tomando todas las medidas de precaución y sanitarias para evitar una contaminación al medio de cultivo y material vegetativo por esto la desinfección de nuestras manos y los materiales utilizados se los hace continuamente.

10.8.2 Traslado al cuarto de crecimiento

La siembra de todas los explantes se efectuó al sellarlos con una funda plástica y anotar la fecha que se realizó la siembra y el ingreso a la habitación de crecimiento o desarrollo en la cual continuaron por un periodo de 30 días con una iluminación artificial de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y una temperatura de 17°C a 27°C, una vez conseguidos los brotes necesarios, se dio inicio al sistema de multiplicación.

Durante la fase de introducción in vitro se tomó la siguiente variable como es el número de explantes contaminados (NEC).

10.8.3 Numero de explantes contaminados (NEC)

Esta variable que fue registrada a los 30 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo, se observó el número de explantes que estaban contaminados en los 70 frascos que se realizó la introducción del material in vitro esto se lo ejecutó visualmente.

10.9 Fase de multiplicación

En esta fase se seleccionaron los brotes adaptados al medio de introducción, sin contaminación. Los explantes pasaron al medio de multiplicación que es el agar con sus diferentes tipos de hormonas de crecimiento.

Durante la fase de multiplicación se evaluaron los 7 tratamientos de las siguientes hormonas como son: auxinas (AIA), citoquininas (BAP), giberelinas (GA3) y la combinación entre las mismas ya mencionadas.

Tabla 8. Dosis de cada una de las hormonas y combinación que se realizó en la fase de multiplicación

Tratamiento	Código	Descripción	Dosis
T1	BAP	Citoquinina	4ml/L
T2	GA3	Giberelina	1ml/L
T3	AIA	Auxina	2ml/L
T4	BAP+GA3	Citoquinina+Giberelina	4ml/L;1ml/L
T5	GA3+AIA	Giberelina+Auxina	1ml/L;2ml/L
T6	AIA+BAP	Auxina+Citoquinina	2ml/L;4m/L
T7	Testigo	Testigo	

Elaborado por: Carlos Chacón, Oscar Calapiña (2020).

La unidad experimental fue un contenedor de vidrio autoclavable, con tapa (10,5cm de diámetro y 7cm de altura), con tres a cuatro explantes de mora, provenientes de una misma planta madre. Cada frasco conto como una repetición este proceso tuvo una duración de 70 días.

10.10 Variables evaluadas

10.10.1 Longitud de los brotes (LB)

La longitud de los brotes se tomó 5 frascos al azar en cada tratamiento y repetición, desde la base del tallo hasta el ápice de los brotes, se tomó medidas sacando el brote hacia el exterior esto se realizó con la ayuda de una regla y su resultado fue expresado en cm a los 70 días.

10.10.2 Número de brotes por explante (NBE)

Esta variable se registró contabilizando los brotes de cada explante de forma directa por cada tratamiento y repetición a los 70 días.

10.10.3 Número de hojas por brote (NHB)

Para evaluar esta variable se procedió a contar de forma directa el número total de hojas en 5 frascos al azar por cada tratamiento y repetición a los 70 días.

10.10.4 Elaboración del protocolo

Para la elaboración de la propuesta del protocolo se tomó algunas sugerencias, técnicas establecidas en el laboratorio por parte del Ingeniero Eduardo Quinatoa técnico del laboratorio en la cual se desarrolló la investigación.

11 ANALISIS Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS

11.1 Variables agronómicas. Número de explantes contaminados (NEC) a los 30 días, antes de entrar a la fase de multiplicación.

En esta variable estudiada muestra el número de explantes contaminados a los 30 días, poseen el 10% de contaminación. Estos explantes contaminados van a depender de los cuidados sanitarios en los que estarán expuestos, cabe recalcar que también depende de la variedad del material vegetativo que es extraída. También debemos tomar en cuenta que una buena manipulación del material vegetativo podemos evitar una contaminación. (Tabla 9 y Grafico 2)

En cuanto al día que se transfirió este material vegetativo al medio de multiplicación se observó que no es significativo en número de explantes contaminados por lo cual podemos indicar que no existe un mayor porcentaje de explantes contaminados, en lo cual se procedió a transferir al medio de cultivo donde se desarrollaran con la aplicación de las hormonas de crecimiento y su respectiva dosificación de cada tratamiento. (Tabla 9 y Grafico 2)

Tabla 9. Resultado del número de explantes contaminados (NEC) a los 30 días antes de entrar a la fase de multiplicación.

Frascos	NEC
70	8

Elaborado por: Carlos Chacón, Oscar Calapiña (2020).

Figura 2. Porcentaje de explantes contaminados a días de ser transferido a la fase de multiplicación.



Elaborado por: Carlos Chacón, Oscar Calapiña (2020).

NEC: Número de explantes contaminados

11.2 Variable de longitud de los brotes (LB) durante los 70 días que se encontraba en la fase de multiplicación.

De acuerdo con lo realizado la hormona que influyo mayormente a los 70 días en a longitud de los brotes (LB) fue (GA3+AIA) conocidos como la giberelina más la combinación de la auxina donde se muestra como el factor A con una longitud de 6.16cm, este se mostró como el más alto en longitud de todos los tratamientos, pero sin embargo el tratamiento que le sigue es (GA3) giberelina considerado como factor B con una longitud 2,49cm, estos son los dos factores que registran una mayor longitud de brote entre todos los tratamientos aplicados, hay tratamientos que también se consideran como factores B como son: (T) testigo con una longitud 2,40cm, (AIA) auxina con una longitud de 1,63cm, (BAP) citoquinina con una longitud 1,56cm y (BAP+GA3) citoquinina en combinación giberelina con una longitud de 1,40cm, donde no se observó una diferencia significativa entre estos tratamientos ya mencionados, mientras que en el factor C es el tratamiento (AIA+BAP) es la auxina en combinación citoquinina con una longitud de 0,77cm, se observó que en este factor si se puede ver la diferencia de longitud que tiene entre los otros tratamientos, pero sin embargo realizado el análisis respectivo nos muestra que no son significativamente diferentes. (Tabla10)

Tabla 10. Resultado de la variable de longitud de los brotes (LB) durante 70 días.

Tratamientos	Longitud de brotes	
GA3+AIA	6,16	A
GA3	2,69	B
T	2,40	B C
AIA	1,63	B C
BAP	1,56	B C
BAP+GA3	1,40	B C
AIA+BAP	0,77	C

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

Elaborado por: Carlos Chacón, Oscar Calapiña (2020).

En la variable de longitud de brotes a los 70 días de haber realizado el ingreso del material vegetativo, las hormonas que tuvieron el mayor porcentaje de crecimiento fueron la (GA3+AIA) Giberelina en combinación con la Auxina con una longitud de 1,63cm seguido de la (GA3) Giberelina con una longitud de 2,69cm, el tratamiento que menor longitud presento fue (AIA+BAP) la auxina en combinación con la citoquinina con una longitud 0,77cm donde se observó una diferencia, esto no concuerda con lo expuesto por (Vaca Suquillo, 2012) que manifiesta que la (BAP) Citoquinina es la mejor para el incremento de la longitud de brotes ya que esta hormona interviene en la división celular y la elongación.

11.3 Variable del número de brotes por explante (NBE) durante los 70 días que se encontraba en la fase de multiplicación.

Con el análisis que se realizó se puede observar que la hormona que mayor número de brotes por explante (NBE) se obtuvieron del tratamiento (BAP) citoquinina con 7,10 % de explantes, que se muestra como el factor A, seguido del tratamiento (BAP+GA3) citoquinina en combinación con la giberelina con 4,10% de explantes, que se muestra como el factor B, estos son los dos tratamientos que mayor porcentaje de explantes se obtuvieron a los 70 días, pero sin embargo los tratamientos considerado como factores C, también presentan un porcentaje de brotes, que no son significativamente diferentes a los factores A y B, los factores C son los siguientes (AIA+BAP) auxina en combinación con la citoquinina con 2,20% de explantes,(GA3)la giberelina con 1,50% de explantes, (GA3+AIA) la giberelina más la combinación de la auxina con 1,10% de explantes, (AIA) la auxina con 1,00% de explantes y por último el (T) testigo con 1,00% de explantes, según el análisis realizado muestra que no son significativamente diferentes, pero sin embargo el tratamiento que menos números de

brotos por explante se obtuvieron es el (AIA), (T). (Tabla 11)

Tabla 11. Resultado de la variable del número de brotes por explante (NBE) a los 70 días.

Tratamientos	Número de brotes por explante	
BAP	7,10	A
BAP+GA3	4,10	B
AIA+BAP	2,20	C
GA3	1,50	C
GA3+AIA	1,10	C
AIA	1,00	C
T	1,00	C

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

Elaborado por: Carlos Chacón, Oscar Calapiña (2020).

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que en la variable del número de brotes por explantes que mejor rendimiento presento fue la hormona (BAP) citoquinina con el 7,10% de explantes seguido de (BAP+GA3) la citoquina en combinación con la giberelina con el 4,10% de explantes, y el tratamiento que menor porcentaje de explantes se obtuvieron fue (T) testigo con el 1,00% de explantes, este resultado concuerda con lo mencionado por (Maldonado, 2014), que la (BAP) es considerada como el mejor medio de multiplicación ya que la citoquinina interviene en la división celular, por lo cual es el más utilizado para obtener un mayor número de brotes.

11.4 Variable del número de hojas por explante (NHE) a los 70 días de haberse encontrado en la fase de multiplicación.

Con el análisis que se realizó se puede observar que la hormona que mayor porcentaje de número de hojas por explante (NBE) se obtuvieron del tratamiento (GA3+AIA) giberelina en combinación de la auxina con el 10,20% de número de hojas, que se muestra como el factor A, seguido de la (GA3) giberelina con el 10,00% de número de hojas, este tratamiento también es considerado como un factor A, pero sin embargo hay otros tratamientos considerados como factores A como son: (T) testigo con el 9,60% de número de hojas, (AIA) auxina con el 9,40% de número de hojas estos tratamientos no son significativamente diferentes y como factores B se encuentran los tratamientos (BAP) citoquinina con el 6,70% de número de hojas, (BAP+GA3) citoquinina en combinación de la giberelina con el 6,50%

de número de hojas y (AIA+BAP) auxina en combinación de la citoquinina con el 5,90% de número de hojas, donde no son significativamente diferentes, pero sin embargo el tratamiento que menos números de hojas por explante se obtuvieron es el (AIA+BAP). (Tabla 12)

Tabla 12. Resultado de a variable del número de hojas por explante (NHE) a los 70 días.

Tratamientos	Número de hojas por explante
GA3+AIA	10,20 A
GA3	10,00 A
T	9,60 A
AIA	9,40 A
BAP	6,70 B
BAP+GA3	6,50 B
AIA+BAP	5,90 B

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

Elaborado por: Carlos Chacón, Oscar Calapiña (2020).

La aplicación de las diferentes hormonas de crecimiento influyeron en la variable de número de hojas de acuerdo a los resultados obtenidos en la tabla 13 (GA3+AIA) giberelinas en combinación de la auxina con el 10,20% de número de hojas, seguido (GA3) de la giberelina con el 10,00% de número de hojas con la cual estos dos tratamientos se obtuvieron mejor resultado en cuanto al número de hojas por explante, el tratamiento que menor eficacia tubo es (AIA+BAB) la auxina en combinación con la citoquinina con el 5,90% de número de hojas, esto no concuerda con lo expuesto por (Sigarroa-Rieche, 2011), donde menciona que en el cultivo in vitro de mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*) que la utilización de la (GA3) presento el mejor desarrollo en combinación con la (BAP) en mayor producción de hojas.

Por lo tanto, según los resultados obtenidos en la investigación de la mora que es una especie que se puede propagar mediante el cultivo in vitro, la cual se acepta la hipótesis planteada para esta investigación que es el protocolo que se desarrolló en base a la utilización de hormonas de crecimiento y la unión de elementos del medio de cultivo si permite el desarrollo vegetativo de la mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*) a partir de micro estacas.

11.5 Protocolo establecido.

- Protocolo de recolección.

El material vegetativo debe ser recolectado en la misma zona debe ser libre de plagas enfermedades de una planta madre joven que tenga un excelente estado fisiológico y tenga una buena producción, la recolección se lo realiza de la parte inferior de la planta el material recolectado debe ser ni tan maduro ni tan precoz para que puede tener un mejor desarrollo.

- Protocolo de preparación del material vegetativo

Se debe realizar la desinfección del área de trabajo y los materiales a utilizarse y las manos para a continuación realizar la extracción de las hojas del material vegetal a utilizar con mucho cuidado par ano dañar las yemas que se utilizaran seguidamente se realiza cortes transversales de aproximadamente 1.5 a 2 cm con dos yemas que no sean muy maduras ni precoces, una vez realizado este proceso se procede a realizar agrupaciones del material vegetativo en 8 partes una vez terminada la agrupación se prosigue a llevar el material vegetativo al área de desinfección.

- Protocolo de desinfección

Para realizar el protocolo de desinfección se realizar el lavado de manos con agua y jabón comercial para eliminar todo tipo de patógenos existentes y poder manipular el material vegetal, una vez realizada el lavado de manos se realiza un proceso de tres fases de desinfección para desinfectar los ex plantas se utiliza en Lavado dos soluciones como el hipoclorito de sodio 70% y alcohol en un 30% por un lapso de (15 minutos) que son tres enjuagues con agua destilada completamente estéril bajo la cámara de flujo laminar por un lapso de 5 minutos cada enjuague.

- Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo fue preparado con diferentes sustancias como son:

- Bases de sales
- Hormonas
- Agua destilada
- Reguladores de PH

- Agar
- Sacarosa
- Reguladores del desarrollo vegetal
- Inositol
- THCL

Se procede a realizar las respectivas pesas (gr) para la preparación del medio se utiliza la sacarosa que debe ser 30gr/l el MS es de 4.3gr/l, inositol 100mg/l, las hormonas con diferentes pesos, el agar que debe ser 400gr/ml se procede a realizar la mezcla utilizando un tubo de ensayo de 100ml para medir el agua destilada y proceder a colocarlo en el Erlenmeyer y llevarlo al agitador magnético donde se procede a colocar todas las sustancias para tener un caldo uniforme una vez terminado el proceso se lo retira y se lo coloca en 4 balones volumétricos la cantidad de 250ml en cada uno para procederlo a ingresar a el microondas por un lapso de 10 a 15 minutos que logre la ebullición al terminar este periodo de tiempo se procede a colocar en los frascos una mínima cantidad que logre sostener al material vegetal una vez completado el proceso de traslado se procede a llevarlo al auto clave por un lapso de 30 minutos para tener una consistencia gelatinosa, una vez terminado todo este proceso se procede a llevarlo al cámara de flujo laminar donde se realizara el ensayo.

Para continuar con el proceso de preparación del medio de cultivo

- Desinfección de los materiales a utilizarse

Los materiales fueron desinfectados con alcohol industrial y alcohol antiséptico, pero se realizó una mezcla con el agua destilada, el porcentaje de alcohol que se utilizó es 70% mientras que de agua destilada se utilizó un 30%, también se manipuló la máquina autoclave con el objetivo de tener una desinfección más eficaz.

- Ingreso del material vegetativo al cuarto de cultivo

Para este proceso el material vegetativo tuvo que estar libre de patógenos y enfermedades, en lo cual ya pasó por una serie de desinfecciones, en el cuarto de cultivo se controló los factores climatológicos donde se obtuvieron explantes de buena calidad y de buen material genético.

11.6 Análisis de costo

Para este respectivo análisis de costos de los tratamientos se pudo evidenciar que los mayores costos en los tratamientos es el T6 con una dosis 2ml/L+4ml/L con un precio de 57,75USD.

Tabla 13. Análisis de costos de la investigación.

Costos	Material vegetativo	Alquiler de materiales y equipos	Transporte	Costo de hormonas	Costo por planta	Costo total
AIA 2ml/L	0,10	40	15	1,20	0,40	56,70
GA3 1ml/L	0,10	40	15	1,00	0,40	56,50
BAP 4ml/L	0,10	40	15	1,05	0,40	56,55
GA3+AIA 1ml/L+2ml/L	0,10	40	15	2,20	0,40	57,70
BAP+GA3 4ml/L+1ml/L	0,10	40	15	2,00	0,40	57,50
AIA+BAP 2ml/L+4ml/L	0,10	40	15	2,25	0,40	57,75
T	0,10	40	15	0,00	0,30	55,40
Total, de costos	0.70	280	105	9.50	2.70	398.10

Elaborado por: Carlos Chacón, Oscar Calapiña (2020).

12 IMPACTO (técnico, social, ambiental o económico)

- Técnicos

Esta investigación realizada genero impactos técnicos de gran importancia en el ámbito agrícola, ya que presenta unos resultados eficientes en cuanto a la propagación de la mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*), siendo así una alternativa con impactos beneficiosos para los agricultores ya que obtienen plantas libres de plagas y enfermedades.

- Social

El impacto social generado en este proyecto es muy grande, debido a la sociedad que hoy en día vivimos, necesitan plantas de buena calidad y de una mayor producción, con el cultivo in vitro o de tejidos se puede obtener una multiplicación acelerada de cualquier especie vegetal y a la vez conservando el material genético de nuestras especies.

- Ambiental

El impacto ambiental con la utilización de la propagación de cultivos in vitro se ha mostrado que es de gran importancia ya que con esta técnica se pueden obtener una multiplicación masiva de especies vegetales y así reduciendo el impacto ambiental que existe hoy en día en nuestro planeta.

- Económicos

En este proyecto realizado genero impactos económicos beneficiosos en el uso de cultivos in vitro, debido a que genera efectos considerables en el cultivo y así obteniendo unos buenos resultados, en cuanto a la propagación, ya que en la actualidad las especies vegetales que son mejoradas genéticamente tienen un costo alto, con esta técnica se trata de obtener plantas de buena calidad que conserven su material genético y a un menor costo.

13 Presupuesto

El presupuesto establecido se presenta en la siguiente tabla 14

Tabla 14. Presupuesto de la investigación.

Recursos	Unidad	Cantidad	Valor unitario (USD)	Valor total (USD)
A. Costos Directos				
1. Mano de obra				
Recolección del material vegetativo	jornal	10	0,2	2
Preparación del material vegetativo	jornal	2	12	24
Establecimiento del material aséptico	jornal	2	12	24
Instalación de los frascos	jornal	2	12	24
Control de condiciones ambientales	jornal	3	1,5	4,5
Subtotal				102
2. Insumos				
Hormonas	l	6	50	300
Hipoclorito de sodio	l	1	10	10
Agar	l	1	30	30
Alcohol	gl	1	20	20
Agua destilada	l	1	10	10
Sales minerales	kg	1	25	25
Subtotal				395
Total, cotos directos				
B. Costos indirectos				
Materiales				
Vasos de precipitación	Unidad	70	0,5	35
Caja de bisturí	Unidad	1	10	10
Paquete de servilletas	Unidad	2	2	4
Paquete de mascarillas	Unidad	1	0,1	4
Tubos de ensayo	Unidad	2	0,5	1
Mechero	Unidad	2	15	30
Probeta	Unidad	6	5	30
Frascos de vidrio	Unidad	70	0,25	17,5
Pinzas	Unidad	2	2	4
Mandil	Unidad	2	8	16
Trasporte	Unidad	15	4	60
Viáticos	Unidad	15	4	60
Equipos				
Cámara de flujo laminar	Unidad	1	50	50
Autoclave	Unidad	1	50	50
Balanza analítica	Unidad	1	50	50
Plancha de calentamiento	Unidad	1	50	50
Agitador magnético	Unidad	1	50	50
pH – Metro	Unidad	1	30	30
Microondas	Unidad	1	12	12
Subtotal				563,5
Total de costos indirectos				563,5
TOTAL DE COSTOS				1060,5

Elaborado por: Carlos Chacón, Oscar Calapiña (2020).

14 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

14.1 Conclusiones

- Se identificó las características adecuadas (sanidad vegetal) para el trabajo del laboratorio, se pudo demostrar la eficacia que se obtuvo en el desarrollo del protocolo de propagación *in vitro* de cultivo de mora sin espina (*Rubus glaucus benth*) que se realizó con normalidad y en la cual se logra evidenciar mediante los resultados y datos obtenidos en la investigación.
- Las condiciones adecuadas identificadas para la desinfección del material de partida con mayor porcentaje de viabilidad, el área de trabajo se debe mantener siempre limpia y libre de cualquier patógenos, para un medio aséptico se debe utilizar diferentes sustancias siendo más eficaz la utilización del mechero y el hipo clorito de sodio en un 70 % de su concentración acompañado de alcohol en un 30 % siendo utilizados cada vez que se realice una nueva introducción del material vegetativo la aireación debe ser continua de la cámara de flujo laminar y así obteniendo un 10% de contaminación en la fase de introducción.
- El tratamiento 5 es la combinación de la giberelina con la auxina (GA3 1ml/L + AIA; 2ml/L) con un pH 5.7., fue el que llegó a presentar un mejor resultado en cuanto a la longitud de los brotes 6,16 cm también se obtuvo un mayor número de hojas, siendo este el establecimiento óptimo para la instalación *in vitro* de la mora de castilla sin espina.

14.2 Recomendaciones

- La recolección del material vegetal a utilizarse no se lo debe efectuar en días con altas precipitaciones pluviales ya que debido alto porcentaje de humedad puede llegar a generar dificultad de contaminación *in vitro*
- El material vegetativo para utilizarse se lo debe escoger de una planta madre de una excelente calidad, que esté libre de plagas y enfermedades que sea joven para que de esta manera estas tengan una mejor y alta capacidad de generar tejidos y así evitar contaminación o muerte del material vegetal.
- De acuerdo con los datos que se obtuvo en la investigación se recomienda utilizar el tratamiento número 5 que es la combinación de la Giberelina y la Auxina, debido a que tuvo

un mejor desarrollo vegetativo a comparación de los otros tratamientos este obtuvo una mayor longitud de los brotes y mayor número de hojas

- Se recomienda seguir con la investigación para las etapas como es la de enraizamiento y aclimatación y posteriormente a la de siembra en campo.

15 BIBLIOGRAFÍA

- Almachi Chiluisa, & Yesenia., N. (2017). *Caracterización morfológica y Fisico-química de frutos 7 ecotipos de mora (Rubus glaucus Benth), bajo dos densidades de siembra en Tumbaco (Tesis de Ingeniería, Universidad Central de Ecuador).* Repositorio Digital, Quito. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/12829>
- Alonso, P., & Jiménez, E. (2011). *Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. Biotecnología vegetal (Tesis de Ingeniería).* Biotecnología vegetal.
- Angulo Catro, J. B. (2012). *Efecto de radiación UV-C sobre el contenido de antioxidantes de mora de castilla (Rubus glaucus) sin espina (Tesis de Ingeniería, Universidad Tecnológica Equinoccial).* Repositorio Digital. Obtenido de <http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/4973>
- Calero. (2010). *Propiedades nutricionales de la mora.* Repertorio Institucional.
- Cárdenas Castillo, Y. Y. (2013). *Evaluación Agronomica y fenología de dos clones de mora sin espina (Rubus glaucus Benth) para determinar su potencial comercial. (Tesis de Ingeniería. Universidad Central).* Repositorio Digital, Tumbaco - Ecuador. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/1005>
- Casco Olivo, D. W. (2013). *Evaluación del desarrollo de estacas de mora de castilla (Rubus glaucus) contres tipos de sustratos en las cuatro fase lunares en el Cnatón Chillanes (Tesis de Ingeniería, Universidad Estatal de Bolivar. Facultad de Cinecias Agropecuarias).*
- Castillo, A. (2004). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nosacompañá hace mucho tiempo. Uruguay: AR-VITRO: INIA.(Tesis de ingeniería).*
- De Bogotá, C. D. (2015). *Manual mora (Tesis de Ingeniería).*
- Espin Chico, & Cecilia., M. (2013). *Comportamiento tecnologico limpio y organico, con y sin trichoderma para el manejo del cultivo de mora de castilla (Rubus glaucus Benth) en el Canton Cevallos Provincia de Tungurahua, (Tesis de Ingeniería, Escuela SuperiorPolitecnica de Chimborazo).* Repositorio Institucional. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/2370>

- Freire Salazar, V. H. (2012). *Alternativas de mejora en el manejo de postcosech y comercialización de la mora de castilla (Rubus glaucus Benth) proveniente de la provincia de Tungurahua (Tesis de Ingeniería, Quito 2012)*. BIBDIGITAL. Obtenido de <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/4609>
- Gordo, D. G., & Pacheco, J. (2012). *Sustancias utilizadas como agentes gelificantes alternativas al agar en medios de cultivo para la propagación in vitro*. *Revista de investigación Agraria y Ambiental* 3(2), 49-62 (Tesis de Ingeniería). *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. Obtenido de <https://doi.org/10.22490/21456453.972>
- Guamán Carrasco, D. J. (2018). *Desarrollo de un protocolo de establecimiento in vitro de mora de castilla (Rubus glaucus benth) a partir de meristemos axilares (Tesis de Ingeniería, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos)*. Repositorio Digital.
- Guerrón Mallamas, A. G., & Espinosa Chuquín, E. R. (2014). *Evaluación de diferentes tipos de estacas al enraizamiento con la utilización de dos tipos de auxinas (ana eiba) con tres dosis para la producción de plantas de mora de castilla (Rubus glaucus benth), (Tesis de Ingeniería Universidad Técnica del Norte)*. Repositorio Digital, Tumbaco-Quito. Obtenido de <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/2637>
- Hernandez, C. L. (1999). *Desarrollo de un protocolo para la propagación masiva de la mora de castilla (Rubus glaucus benth) mediante la utilización del cultivo de tejidos vegetales in vitro*. *Actualidades biológicas (Tesis de Ingeniería)*. *Actualidades Biológicas*. Obtenido de <https://revistas.udea.edu.co/index.php/actbio/article/view/329760>
- Jarrín Cerda, M. A. (2017). *Evaluación in vitro de productos convencionales de alternativas para el control de *Cylindrocarpon destructans* en mora de castilla (Rubus glaucus) (Tesis de Ingeniería; Quito, Universidad de las Américas, 2017)*. Trabajos de Titulación. Obtenido de <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/7389>
- Jordán, J. . (2006). *Hormonas reguladoras de crecimiento, auxinas, giberelinas y citoquininas*. Squeo, F, A U Cardemil. (eds). *Fisiología vegetal 1-28 (Tesis de Ingeniería)*.
- Limaico Torres, D. E. (2018). *Evaluación de métodos de desinfección y control de la fenolización en semillas de arrayán (*myricaria rhopaloides*) para la germinación " in*

vitro" en Ibarra Ecuador (Tesis de Ingeniería). Repositorio Digital Universidad Técnica del Norte. Obtenido de <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/7898>

- Lligüín, L., & Manuel, M. (2015). *Uso de auxinas en tres tiempos para el enraizamiento de estacas de mora de castilla sin espina (Rubus glaucua Benth), (Tesis de Ingeniería, Universidad Central). Quito. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/4789>*
- Lligüín, L., & Remigio, M. (2015). *Uso de auxinas a tres tiempos para el enraizamiento de estacas de mora de castilla sin espina (Rubus glaucus Benth), (Tesis de Ingeniería, Universidad Central del Ecuador). Quito. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/4789>*
- Maldonado, C. I. (2014). *EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EXPLANTES DE MORA SIN ESPINA "Rubus glaucus Benth" EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN VEGETATIVA EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (Ingeniería Tesis Escuela Superior del Ejercito). Obtenido de <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/8789/1/T-ESPE-048078.pdf>*
- Martínez, P., & Alfonso., A. (2017). *Caracterización participativa de artropodos fitofagos en el sistema de reproducción de mora sin espina (Rubus glaucus) en el departamento de Risalda (Tesis de Doctorado, Universidad de Cladas).*
- Morales, C., Sulay, D., & Inlago Bautista, J. C. (2016). *Evaluación de las características agrónomicas y pomológicas de dos clones experimentales de una variedad de mora de castilla, (Tesis de Ingeniería, Universidad Técnica del Norte). Otavalo-Imbabura. Obtenido de <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/5342>*
- Morales, F. (2010). *Conozca 3 tipos de investigación: Descriptiva, Exploratoria y Explicativ. .*
- Moreno Guerrero, C., Andrade Cuvi, M., A, T. G., Túqueres Ushca, A., & Concellón, A. (2016). *Efecto del uso combinado de radiación UV-C y atmósfera modificada sobre el tiempo de vida util de mora de castilla (Rubus glaucus) sin espina(Tesis de Ingeniería). Revista Iberoamericana de Tecnología. Obtenido de <http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/5031>*
- Ovideo, C., & Andrés., S. (2017). *Determinación de bioaccesibilidad a compuestos anti oxidantes en mora sin espinas (Rubus glaucus) tratada con radiación UV-C mediante*

- digestión in vitro*(*Ciencias de la Ingeniería, Universidad Tecnológica Equinoccial*). Repositorio Digital. Obtenido de <http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/16699>
- Pasquel, A. (2010). *Gomas: una paroximación a la industria de alimentos*. (*Tesis de Ingeniería*).
 - Ponoluisa, B., & Estuardo, W. (2013). *Escarificación química de la semilla de mora de castilla (Rubus glaucus Benth) variedad Colombiana si espinas* (Tesis de Ingeniería, Universidad Técnica de Ambato). Depositorio Digital. Obtenido de <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/3946>
 - Rodriguez, V., & Elizabeth, J. (2014). *Desarrollo de un protocolo para la obtención de un callo a partir de tejidos de mora de castilla sin espinas (Rubus glaucus) en un medio estandar de cultivo* (*Tesis de Ingeniería, Universidad Tecnológica Equinoccial*). Repositorio Institucional, Quito-Ecuador. Obtenido de <http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/5106>
 - Rodriguez Vazquez., J. E. (2014). *Desarrollo de un protocolo para la obtención de callo a partir de tejidosde mora de Castilla sin espina (rubus glaucus) en un medio estandar de cultivo* (Facultad: Ciencias de la Ingeniería, Universidad Tecnológica Equinoccial). Repositorio Institucional. Obtenido de Reposito institucional: <http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/5106>
 - Sandra Sharry, M. A. (2009). *DISEÑO Y ORGANIZACIÓN DEL LABORATORIO DE CULTIVO IN VITRO DE PLANTAS*. (Tesis de Ingeniería). Obtenido de https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/40919/mod_resource/content/1/plantas%20de%20probeta__.pdf-PDFA.pdf#page=22
 - Sigarroa-Rieche, y. C. (2011). *Stablishment and in vitro multiplication of thornless blackberry (Rubus glaucus Benth.) by shoot apical meristems*(*acta agronomica*, 60(40), 347-354).
 - Szabados, L. N. (1991). *Agentes gelatinizadores en el cultivo de tejidos. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Turrialba, 966*. (Tesis de Ingeniería). Obtenido de <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%201a%20Agricultura/capitulo4.pdf>
 - Vaca Suquillo, I. D. (2012). *Regeneración de plantas completas de rubus glaucus (benth), mediante el uso de reguladores de crecimiento*(tesis de Ingeniería, Escuela

Superior Politecnica del Litoral). Obtenido de <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/25141>

- Vichuela, G. E. (2014). *Caracterización Morfológica de los hongos fitopatógenos en el cultivo de mora de castilla (Rubus glaucus Benth) sector huachi chico-Ambato-Tungurahua, 2014 (Tesis de Ingeniería)*. Biblioteca General. Obtenido de <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/2536>
- Villalobos, V. ..., & Thrope, T. A. (1991). *Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. Cultivos de tejidos en la agricultura, (Tesis de Ingeniería)*.

16. ANEXOS

Anexo 1. Hoja de vida del docente tutor.

HOJA DE VIDA

Apellidos: Espinosa Cunuhay
Nombres: Kleber Augusto
Cédula de Identidad: 0502612740
Teléfonos: 0995463215-032250251
Correo electrónico: kleber.espinosa@utc.edu.ec
/espinosakleber23@yahoo.es



- ✓ Universidad Técnica de Cotopaxi, Maestría en Gestión de la Producción
- ✓ Coordinador de la Carrera de Ingeniería Agronómica, Universidad Técnica de Cotopaxi – Extensión La Maná
- ✓ Docente Investigador- Responsable del Comité de Editorial, Universidad Técnica de Cotopaxi – Extensión La Maná
- ✓ Responsable del proyecto de Creación de la Unidad Educativa, Unidad Educativa Comunitaria Intercultural Bilingüe Cesar Sandoval Viteri
- ✓ Responsable del Proyecto de Germoplasma de Semillas de Papas Nativas del Sector Maca Ugshaloma con el Plan Internacional y el INIAP

TEXTOS ESCRITOS

- ✓ **Evaluación agronómica de hortalizas de hoja, Col china y nabo**

ISBN: 978-3-8417-6367-9

Editorial Académica Española

Disponible en: <https://www.eae-publishing.com/catalog/details/store/es/book/978-3-8417-6367-9/evaluaci%C3%B3n-agron%C3%B3mica-de-hortalizas-de-hoja?search=hortalizas>

ARTICULOS CIENTIFICOS

- ✓ **Efecto de diferentes abonos orgánicos en la producción de tomate (*Solanum lycopersicum*, L)**, publicado en la revista Biotecnia Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud, 11 de diciembre 2016 disponible en: <http://biotecnia.unison.mx>
- ✓ **Evaluación agronómica del babaco (*Carica pentagona*), con dos fertilizantes químicos en diferentes dosis en el Cantón Pangua**, publicado en la revista UTC ciencia latindex, agosto de 2016 ISSN 1390- 6909. Disponible en <http://www.utc.edu.ec/LinkClick.aspx?fileticket=o0SU5nuTvrs%3d&portalid=043>
- ✓ **Respuesta de variedades de papa (*Solanum Tuberosum*, L) a la aplicación de abonos orgánicos y fertilización química**, publicado en la revista Ciencia y Tecnología de la UTEQ latindex, junio de 2016 con ISSN 1390-4051 Impreso.

Anexo 2. Hoja de vida del estudiante investigador.

CURRICULUM VITAE

DATOS

PERSONALES:

Apellidos: Chacón Tubón

Nombres: Carlos Andrés

Nº de Cédula: 055005974-5

Fecha de Nacimiento: 28 de octubre de 1995

Correo electrónico:

andreschacont@gmail.com

Lugar de nacimiento: Latacunga

Nacionalidad: Ecuatoriano

Estado civil: Soltero

Celular: (593) 0995695517

Dirección: El Triunfo- La Maná.



ESTUDIOS REALIZADOS:

Primer Nivel: Escuela 14 de abril

Segundo Nivel: Colegio Técnico Ramón Barba Naranjo”

Tercer Nivel: Universidad Técnica de Cotopaxi

CERTIFICADOS OBTENIDOS:

- Suficiencia en inglés: Universidad Técnica de Cotopaxi.
- 2016. I. Jornadas Científicas Agronómicas. UTC – La Maná, Ecuador.
- 2017. II. Jornadas Científicas Agronómicas. UTC – La Maná, Ecuador.
- 2018. III. Jornadas Científicas Agronómicas. UTC – La Maná, Ecuador.

Anexo 3. Hoja de vida del estudiante investigador**CURRICULUM VITAE****DATOS****PERSONALES:****Apellidos:** Calapiña

Malliquinga

Nombres: Oscar Fernando**Nº de Cédula:** 055007099-9**Fecha de Nacimiento:** 7 de enero de 1995**Correo electrónico:**of524874@gmail.com**Lugar de nacimiento:** Salcedo**Nacionalidad:** ecuatoriano**Estado civil:** Soltero**Celular:** (593) 0958840030**Dirección:** El Triunfo- La Maná.**ESTUDIOS REALIZADOS:****Primer Nivel:** Escuela José Mejía Lequerica**Segundo Nivel:** Colegio “Nacional Primero de Abril”**Tercer Nivel:** Universidad Técnica de Cotopaxi**CERTIFICADOS OBTENIDOS:**

- Suficiencia en inglés: Universidad Técnica de Cotopaxi.
- 2016. I. Jornadas Científicas Agronómicas. UTC – La Maná, Ecuador.
- 2017. II. Jornadas Científicas Agronómicas. UTC – La Maná, Ecuador.
- 2018. III. Jornadas Científicas Agronómicas. UTC – La Maná, Ecuador

Anexo 4. Fotografías de preparación del medio de cultivo en la fase de introducción.



Salaes oxisales



El agar

Anexo 5. Fotografías del material vegetal siendo introducido la fase de introducción.



Fase de introducción



Corte de yemas

Anexo 6. Fotografías de medios de cultivo contaminados en la fase de introducción.



Frasco no contaminado

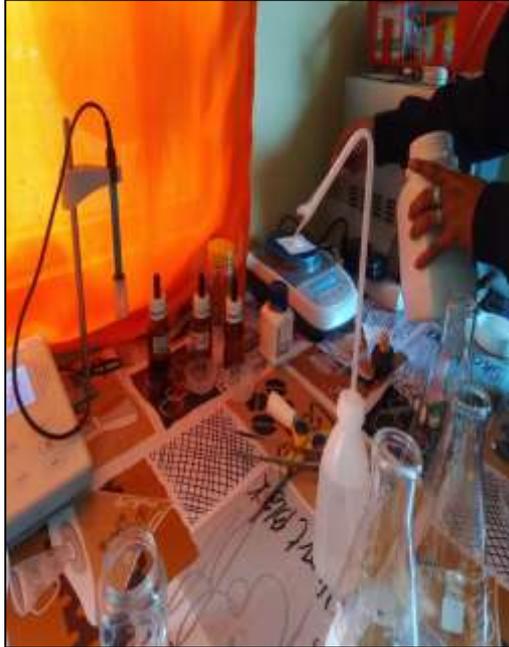


Frasco contaminado

Anexo 7. Fotografías de la preparación de medios de cultivo en la fase de multiplicación.



División de medios de cultivo



Introducción de hormonas de crecimiento a los medios de cultivo.

Anexo 8. Fotografías de introducción del material vegetal a la fase de multiplicación.



Extracción material vegetal



Tratamientos

Anexo 9. Fotografías de tratamientos que mejor resultados presentaron en la investigación.



Tratamiento 2 (Giberelina)



Tratamiento 5 (Auxina + Citoquinina)

Anexo 10. Fotografías de los resultados de los tratamientos aplicados en la investigación.



Tratamiento 4 (Giberelina + Auxina)



Tratamiento 6 (Citoquinina + Giberelina)



Tratamiento 3 (Auxina)



Tratamiento 1 (Citoquinina)



Tratamiento 7 (Testigo)

Anexo 11. Fotografías de toma de datos.



Longitud de la planta



Números de brotes