

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

Carrera:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE *Brassica oleracea* var. *Italica*.

AUTORAS:

EVELIN NATHALY MASACHE ALMEIDA

JOHANA GABRIELA MENESES MORILLO

DIRECTORA:

IVONNE DE LOS ANGELES VACA SUQUILLO

Quito, julio del 2018

Cesión de derechos de autor

Nosotros Evelin Nathaly Masache Almeida y Johana Gabriela Meneses Morillo con documento de identificación N° 1750305680 y N° 1723140826 respectivamente, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras del trabajo de titulación intitulado: "EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE *Brassica oleracea* var. *Italica*.", mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieras en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Evelin Nathaly Masache Almeida

1750305680

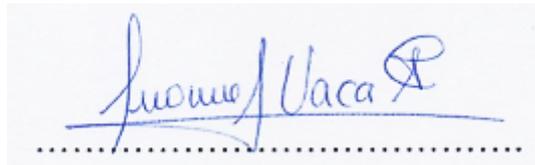
Johana Gabriela Meneses Morillo

1723140826

Quito, Julio 2018

Declaratoria de coautoría del docente tutora

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, “EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE *Brassica oleracea* var. *Italica*”, realizado por Evelin Nathaly Masache Almeida y Johana Gabriela Meneses Morillo, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerado como trabajo final de titulación.



Ivonne de los Ángeles Vaca Suquillo

C.I: 1714726906

Quito, Julio 2018

Dedicatoria

A Dios por permitirme concluir esta etapa de mi vida.

A mis padres, Maximiliano y Pilar por brindarme su amor incondicional y apoyo, por ser el ejemplo a seguir e inculcarme el respeto y la humildad ante todo, gracias por toda su dedicación y amor.

A mi hermano, Andrés por estar siempre a mi lado en todos los momentos de mi vida, por haberme brindado fortaleza y apoyo en cada decisión tomada.

A Luis, por su amor y motivación para poder alcanzar todos mis sueños y por la alegría que me brinda cada día.

Evelin Nathaly Masache Almeida

A Dios por iluminar día a día mi camino.

A mis amados abuelos Ángel Morillo e Inés Guevara, mi abnegada madre Violeta Morillo, a mi hermana Adriana Meneses, tíos Sonia, Patricio, Marcelo, William Morillo y amigos, les dedico este logro alcanzado al culminar un ciclo importante de mi vida, diciéndoles que todo esfuerzo ha valido la pena.

A la MSc. Margarita Guarderas también le dedico este logro por su acogida y apoyo incondicional durante toda mi trayectoria universitaria.

Johana Gabriela Meneses Morillo

Agradecimiento

A la Universidad Politécnica Salesiana por permitirnos desarrollar el presente trabajo de investigación.

A nuestra querida Tutora MSc. Ivonne Vaca Suquillo por convertirse en una gran amiga, por dedicarnos su tiempo, consejos y conocimientos sin objeción alguna, convirtiéndose en nuestro apoyo en todo momento.

A los Docentes Dra. María Elena Maldonado, MSc. Viviana Chiluisa, MSc. Daniel Acurio, MSc. Laura Huachi por su confianza, paciencia, enseñanza y amistad que se fortaleció con el paso del tiempo.

A los colaboradores del Proyecto: Evaluación de la eficiencia fotosintética, como indicador de estrés, en frutales y hortalizas andinos, cultivados *in vitro*, los estudiantes Josué Ramírez, Santiago Gallardo, Shirley Herrera y Cristhian Quinchuela por su ayuda brindada para la culminación del presente proyecto.

A los Asistentes de Laboratorio de Ciencias de la Vida por su disposición, amistad y apoyo desinteresado permitiéndonos cumplir cada una de las actividades del presente proyecto.

A Todos muchas gracias.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1	4
1 Marco conceptual.....	4
1.1 <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Italica</i>	4
1.1.1 Localización mundial y nacional	4
1.1.2 Hábitat.....	4
1.1.3 Taxonomía.....	5
1.1.4 Descripción	5
1.1.4.1 Variedades de Brócoli	6
1.1.5 Propiedades y beneficios.....	7
1.2 Cultivo <i>in vitro</i>	7
B	
1.2.2 Generalidades	7
1.2.3 Tipos de cultivo <i>in vitro</i>	8
1.2.4 Aplicaciones del cultivo <i>in vitro</i>	9
1.3 Componentes del medio de cultivo	10
1.3.1 Sales minerales.....	10
1.3.1.1 Macronutrientes	10
1.3.1.2 Micronutrientes	10
1.3.2 Fuente de carbono	11
1.3.3 Reguladores de crecimiento	11
1.3.3.1 Auxinas.....	12
1.3.3.2 Citoquininas.....	12
1.3.3.3 Giberelinas.....	13
1.3.4 Vitaminas y aminoácidos	13
1.3.5 Agentes Solidificantes.....	14
1.3.5.1 pH del medio nutritivo	14
1.4 Medio Murashige y Skoog	14
1.5 Fases de cultivo <i>in vitro</i>	15
1.5.1 Fase 0: Fase preparativa	15
1.5.1.1 Protocolo de desinfección	16
1.5.2 Fase 1: Fase de establecimiento <i>in vitro</i>	16
1.5.3 Fase 2: Fase de multiplicación	17
1.5.4 Fase 3: Fase de elongación.....	17

1.5.5	Fase 4: Fase de enraizamiento.....	17
1.5.6	Fase 5: Fase de aclimatación.....	18
1.5.6.1	Sustratos	18
1.6	Fotosíntesis y Fluorescencia.....	19
1.6.1	Eficiencia fotosintética.....	20
Capítulo 2	22
2	Metodología.....	22
2.1	Localización	22
2.2	Evaluación de sales M&S en dos variedades de brócoli.	22
2.2.1	Elección del explante y Protocolo de desinfección.....	22
2.2.2	Fase de Introducción	23
2.2.2.1	Factores de estudio	23
2.2.2.2	Tratamientos	23
2.2.2.3	Unidad experimental	24
2.2.2.4	Análisis estadístico	24
2.2.2.5	Variables y métodos de evaluación	24
2.2.3	Fase de Multiplicación:.....	26
2.2.3.1	Factores de estudio	26
2.2.3.2	Tratamientos	26
2.2.3.3	Unidad experimental	26
2.2.3.4	Análisis estadístico	27
2.2.3.5	Variables y métodos de evaluación	27
2.3	Fase de aclimatación: Evaluación de sustratos.....	28
2.3.1	Factores de estudio.....	28
2.3.2	Tratamientos.....	28
2.3.3	Unidad experimental	29
2.3.4	Análisis estadístico.....	29
2.3.4.1	Diseño experimental.....	29
2.3.5	Variables y métodos de evaluación.....	29
2.3.5.1	Longitud del tallo	29
2.3.5.2	Porcentaje de enraizamiento.....	29
2.4	Evaluación de la eficiencia fotosintética	30
2.4.1	Fase de multiplicación.....	30
2.4.1.1	Análisis de varianza y análisis funcional para la eficiencia fotosintética	30

2.4.2	Fase de aclimatación	30
2.4.2.1	Análisis de varianza y análisis funcional para la eficiencia fotosintética	31
2.4.2.2	Método de análisis de la actividad fotosintética.....	31
Capítulo 3	32
3	Resultados y discusión.....	32
3.1	Evaluación de sales M&S en dos variedades de brócoli.	32
3.1.1	Fase de introducción	32
3.1.2	Fase de multiplicación.....	36
3.2	Evaluación de sustratos	39
3.2.1	Fase de aclimatación	39
3.3	Evaluación de la eficiencia fotosintética	42
3.3.1	Fase de multiplicación.....	42
3.3.2	Fase de aclimatación	44
Conclusiones	49
Recomendaciones	50
Bibliografía	51

Índice de Tablas

Tabla 1. Tratamientos para la evaluación de las concentraciones de sales M&S al 100 %, 50 % y 25 % en semillas de Brócoli en la fase de introducción y multiplicación <i>in vitro</i>	23
Tabla 2. Tratamientos para aclimatación de dos variedades de Brócoli en dos sustratos diferentes.	28
Tabla 3. Análisis estadístico para las variables porcentaje de germinación, longitud del tallo, color de hoja, consistencia del tallo, número de hojas y diámetro óptimo del tallo, en <i>vitroplantas</i> de Brócoli introducidas al medio M&S.	32
Tabla 4. Promedios \pm error estándar para las variables porcentaje de germinación, longitud del tallo, color de hoja, consistencia del tallo, número de hojas y diámetro óptimo del tallo al evaluar las concentraciones de sales en explantes de brócoli introducidas al medio, a los 15 días de evaluación	33
Tabla 5. Análisis estadístico para las variables longitud del tallo, porcentaje de brotación y diámetro óptimo del tallo durante la fase durante la multiplicación <i>in vitro</i>	36
Tabla 6. Promedios \pm error estándar para las variables longitud del tallo, porcentaje de brotación y diámetro óptimo del tallo al evaluar las concentraciones de sales y tratamientos en explantes de brócoli en fase de multiplicación <i>in vitro</i>	37
Tabla 7. Análisis estadístico para las variables longitud del tallo y porcentaje de enraizamiento, para la evaluación de los sustratos.....	39
Tabla 8. Promedios \pm error estándar para las variables longitud del tallo y porcentaje de enraizamiento, al evaluar los sustratos y tratamientos en plántulas de brócoli durante la fase de aclimatación.....	40
Tabla 9. Análisis estadístico para la variable de eficiencia fotosintética, evaluada al ingreso de la fase, durante el ingreso de subcultivo y al final de la fase de multiplicación.	42
Tabla 10. Promedios \pm error estándar para la variable eficiencia fotosintética al evaluar las concentraciones de sales, variedad y tratamientos en explantes de brócoli durante la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	43
Tabla 11. Análisis estadístico para la variable de eficiencia fotosintética para la evaluación semanal de los sustratos durante la fase de aclimatación.....	45
Tabla 12. Promedios \pm error estándar para la variable eficiencia fotosintética al evaluar los sustratos en plántulas de brócoli durante la fase de aclimatación.	46

Índice de Figuras

Figura 1. Escala colorimétrica para hojas de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Italica</i>	25
Figura 2. Coloración de hojas de <i>vitroplantas</i> de brócoli A) M&S al 100 %, B) M&S al 50 %, C) M&S al 25 %.....	34
Figura 3. Plantas de brócoli observada al microscopio A) V1 vitrificada en medio M&S al 25 %, B) V2 no vitrificada en medio M&S al 50 %, C) V1 poco vitrificada en medio M&S al 100 %.....	35
Figura 4. Diámetro del tallo de las <i>vitroplantas</i> de brócoli A) < a 2 mm en M&S al 25 % variedad 1, B) ≥ a 2 mm en M&S al 50 % variedad 2 C) ≥ a 2 mm en M&S al 100 % variedad 1	39
Figura 5. Plantas de brócoli al final de la fase de aclimatación A) V1 y V2 en S1 (turba y bentonita) B) V1 y V2 en S2 (Turba y humus).....	41
Figura 6. Plántulas de brócoli al ingreso de aclimatación A) V1 en S1 y S2, B) A) V2 en S1 y S2.....	45
Figura 7. Curvas de la evaluación semanal de los tratamientos en fase de aclimatación	47
Figura 8. Plántulas de brócoli durante la semana uno y dos de aclimatación A) V1 en S1, B) V2 en S1	47
Figura 9. Plántulas de brócoli durante la semana uno y dos de aclimatación A) V1 en S2 B) V2 en S2.	48

Resumen

La medición de la eficiencia fotosintética en el cultivo *in vitro* presenta múltiples aplicaciones, tales como la regeneración y propagación rápida de plantas completas sanas, factor directamente relacionado con bajos niveles de estrés

El presente trabajo buscó, evaluar la concentración de sales M&S para determinar el medio óptimo en introducción y multiplicación *in vitro*, valorar dos sustratos para la aclimatación y analizar la eficiencia fotosintética en las fases de multiplicación y aclimatación. Para la evaluación de sales M&S las tres concentraciones M1 (100 %), M2 (50 %) y M3 (25 %) resultaron óptimas para la germinación durante introducción *in vitro*, mientras que M1 y M2 fueron adecuados durante multiplicación, al obtener entre 94 al 100 % de brotación y una mayor longitud en las plántulas en un rango de 3,39 a 4,54 cm; para la valoración de sustratos, el sustrato S2 que contenía turba y humus (3:1) resultó óptimo, con un 92 % de plantas enraizadas. Para el análisis de la eficiencia fotosintética la concentración de sales M1, resultó con el menor nivel de estrés (0,71 a 0,73), finalmente el sustrato S2 presentó la eficiencia fotosintética más alta en aclimatación (0,72) permitiendo obtener *vitroplantas* libres de patógenos con buen estado de sanidad, bajos niveles de estrés y una emisión de fluorescencia alta.

Palabras Clave: Brócoli; fluorescencia; fotosíntesis; fotosistema II.

Abstract.

The measurement of the photosynthetic efficiency in the *in vitro* culture presents multiple applications, such as the regeneration and rapid propagation of healthy whole plants, a factor directly related to low levels of stress.

The present work sought to evaluate the concentration of M&S salts to determine the optimum medium *in vitro* introduction and multiplication, to evaluate two substrates for acclimatization and to analyze the photosynthetic efficiency in the multiplication and acclimatization phases. For the evaluation of M&S salts, the three concentrations M1 (100 %), M2 (50 %) and M3 (25 %) were optimal for germination during *in vitro* introduction, while M1 and M2 were adequate during multiplication, obtaining 94 at 100 % budding and a greater length in the seedlings in a range of 3,39 to 4,54 cm; for the evaluation of substrates, the S2 substrate containing peat and humus (3:1) was optimal, with 92 % of rooted plants. For the analysis of the photosynthetic efficiency the concentration of M1 salts, resulted with the lowest level of stress (0,71 to 0,73), finally the substrate S2 presented the highest photosynthetic efficiency in acclimation (0,72) allowing to obtain *vitroplants* pathogen-free with good health status, low stress levels and high fluorescence emission.

Keywords: Broccoli; fluorescence; photosynthesis; photosystem II

Introducción

Brassica oleracea L. var. *Italica*, denominado comúnmente como Brócoli, se ha convertido en uno de los alimentos más cotizados por los múltiples beneficios que presenta (antioxidantes, anticancerígenas y antimicrobianas), posee una producción mundial anual de 42.000 toneladas y una superficie total de más de 20×10^6 hectáreas, destacando Italia con la mayor superficie precedido de China, India y Ecuador (Bisbicuz & Velez, 2015, págs. 24-27), (Mahn, Román, & Reyes, 2016, págs. 95-98).

El Brócoli es una especie nativa de los Andes ecuatorianos, de gran importancia comercial por ser un cultivo no tradicional con alto valor nutritivo (Flores, y otros, 2015, pág. 1163). Esta hortaliza se cultiva en Ecuador por su gran demanda comercial tanto en el mercado interno como externo, de tal forma que en los últimos años ha llegado a ser el principal productor en Sudamérica (Narváez, 2010). De acuerdo a la Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios (2011), el cultivo de brócoli ha aumentado en Ecuador considerablemente desde la década de los noventa, llegando a ser el octavo país exportador a nivel mundial. Actualmente Japón es el primer destino seguido de Estados Unidos, generando en el país un total de 88.900 millones de dólares americanos en valor FOB con la exportación de 64,2 toneladas anuales (Calvopiña, 2015, pág. 28).

Es importante enfatizar que en Ecuador el 98 % del cultivo, está destinado a la exportación llegando a ser parte de la economía familiar de pequeños productores (Narváez, 2010, pág. 17), quienes en muchos de los casos, se ven afectados con grandes pérdidas económicas cuando el cultivo sufre daños, generalmente por patógenos como el hongo *Alternaria* spp., que afecta de manera foliar durante la postcosecha, haciendo que la planta se torne fisiológicamente débil por la invasión de las hifas lo cual reduce la actividad fotosintética del cultivo y causa manchas

necróticas por la destrucción del tejido (Flores, y otros, 2015, pág. 1163). Otras causas que producen pérdidas en el cultivo son las condiciones ambientales (sequía, lluvia, temperaturas bajas y altas etc.) que afectan considerablemente la calidad y la cantidad producida, debido a que genera una deficiencia en los requerimientos de la planta como agua, nutrientes y luz, que interfieren notablemente en el desarrollo de la planta (Fierro & De la Torre, 2013, pág. 16).

Por lo tanto, es importante buscar alternativas para producir plantas sanas de forma rápida, para incrementar la productividad del cultivo (Rangel, Hernández, & Hernández, 2016, págs. 225-226), una de estas alternativas es el cultivo de tejidos, técnica que permite la producción libre de patógenos y además facilita dar seguimiento al estado fisiológico de las plantas mediante la medición de la eficiencia fotosintética, al permitir identificar los cambios generados en el fotosistema II (PSII) con la medición del rendimiento de la fluorescencia de la clorofila; el dato se obtiene al restar entre el nivel máximo de fluorescencia (F_m) y el nivel mínimo de fluorescencia (F_o) lo cual permite determinar la fluorescencia variable (F_v), este valor está altamente relacionado con el estrés sufrido por la planta, debido a que las condiciones de fluorescencia se modifican en situaciones de estrés (Garrido, 2016). Por lo tanto, el desarrollo de un protocolo de cultivo de tejidos para brócoli en conjunto con la determinación de la eficiencia fotosintética permitirá masificar plantas sanas en condiciones controladas, a un coste relativamente bajo y con un adecuado rendimiento fotosintético (con bajos niveles de estrés).

El presente trabajo busca evaluar la eficiencia fotosintética en el cultivo *in vitro* de dos variedades de brócoli, mediante la evaluación de la concentración óptima de sales M&S en establecimiento y multiplicación *in vitro* y el mejor sustrato para su

aclimatación, conjuntamente con la medición de la eficiencia fotosintética en las fases de multiplicación y aclimatación.

Como hipótesis del trabajo se plantea que la medición de la eficiencia fotosintética permite obtener plantas de brócoli con buen estado fisiológico y de sanidad durante la fase *in vitro* y la fase de aclimatación.

Capítulo 1

1 Marco conceptual

1.1 *Brassica oleracea* var. *Italica*

1.1.1 Localización mundial y nacional

Los países exportadores de brócoli a nivel mundial son: España con 32 %, Francia 19 %, Estados Unidos 10 %, Italia 8 %, Ecuador 7 %, México 6 % y China con el 4 % (Bisbicuz & Velez, 2015, págs. 24-27), (Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios, 2011, pág. 4). En Ecuador la exportación de brócoli fue de 1.061,80 USD de una tonelada en 2010. La producción de brócoli se localiza a nivel Nacional en la Sierra Central (Narváez, 2010, pág. 17), Cotopaxi con 68 % de la producción nacional, Pichincha con 16 %, Imbabura con 10 % y provincias con menor producción como Carchi con 3 % y Chimborazo con 2 %, ciudades que proveen al mercado local (Calvopiña, 2015, pág. 28). Entre los años 2007 y 2013 las provincias de Imbabura, Pichincha, Cotopaxi y Chimborazo tuvieron un rendimiento productivo aproximado de 18,86 t/ha, destacando a Cotopaxi como la provincia con mejor rendimiento productivo con 19,80 t/ha, continuando con Pichincha con 17 t/ha, mientras que el resto de provincias poseen en promedio 10 t/ha (Calvopiña, 2015, pág. 28), la baja producción de brócoli sucede por lluvias con granizo y el ataque de plagas como Pulgones y *Plutella* y enfermedades conocidas como mildiu y rizoctonia (Fierro & De la Torre, 2013, pág. 16).

1.1.2 Hábitat

Brócoli se cultiva en suelos francos, arenosos, profundos y bien drenados, tolera un pH de 5,5-6,0 y muy poca la salinidad, su altitud comprende entre 2.200 – 3.200 msnm,

la precipitación óptima es de 400 mm durante el ciclo y 4 mm diarios, con un fotoperiodo de 11 a 13 horas luz (Calvache & Sánchez, 2013, pág. 17).

1.1.3 Taxonomía

La *Brassica oleracea* var. *Italica*, conocida como brécol, bróquil o brócoli, del latín *brachium* que significa «brazo», es una crucífera que actualmente forma parte de la familia de las Brassicáceas (Capinera, 2001, págs. 605-611).

Brócoli presenta la siguiente descripción taxonómica (Tropicos, 2018):

Reino: *Plantae*

Subreino: *Tracheobionta*

Superdivisión: *Spermatophyta*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Equisetopsida*

Orden: *Brassicales*

Familia: *Brassicaceae*

Género: *Brassica* L.

Especie: *Brassica oleracea* L.

Variedad: *Brassica oleracea*. var. *Italica* Plenck

1.1.4 Descripción

El brócoli es un arbusto anual que alcanza un tamaño entre 60 a 80 cm, las inflorescencias de tipo corimbo se caracterizan por formar pequeños ramilletes de flores inmaduras apiñadas denominado pella, de color verde en diferentes tonos (Zamora, 2016, págs. 1-3). Las hojas presentan una gran lamina foliar dentada con un nervio central pronunciado de color verde oscuro y hendido a manera de roseta, en la parte superior de la hoja exhibe una sustancia cerosa que le confiere un color plumizo

(Lizmayer Massri, 2004). Las flores son pequeñas y completas de tono amarillo, con ovario supero y con un punto de inserción al receptáculo de tipo hipógino, tetrapétalo y tetrasépalo (Basantes & Vilema , 2017). El tallo se caracteriza por ser pequeño (25 a 50 cm de altura) y suculento a manera de cruz con un diámetro de 3 a 6 cm (Pucho & Alecu, 2018), con un sistema radicular pivotante y leñoso, poco profundo con una raíz principal de 80 cm de profundidad, las raíces secundarias (Lizmayer Massri, 2004). Los frutos son silicuas de valvas de 3 a 8 semillas con un único nervio longitudinal y levemente convexas (Basantes & Vilema , 2017).

1.1.4.1 Variedades de Brócoli

1.1.4.1.1 Top Head F-1

Se caracteriza por presentar un tamaño de pella uniforme y compacto relativamente grande con un domo alto de color verde oscuro, los floretes son pequeños y de color verde, las hojas son alargadas con limbos ondulados y nervaduras poco marcadas de color grisáceo (PanDia Seeds, 2017). Presenta un tipo de polinización F1 (híbrido que se obtiene en el cruce de dos especies distintas en la primera generación) con una pureza del 99 %, son muy vigorosas en campo y suelen competir con la variedad Advenger en los mercados (PanDia Seeds, 2017).

1.1.4.1.2 Walthan 29

Se caracteriza por presentar una pella poco compacta con granos sueltos de color verde azulado oscuro con un domo pequeño, los floretes suelen ser de color verde, morado o blanco, las hojas presentan bordes ondulados con nervaduras blancas muy marcadas, los pecioloos suelen presentarse desnudos y los tallos son altos y erguidos. Esta variedad es muy tolerante a los climas fríos pero sensible a los climas cálidos (Bimport, 2017).

1.1.5 Propiedades y beneficios

El brócoli presenta numerosos beneficios debido a que posee compuestos como minerales, selenio, vitaminas y principalmente glucosinolatos con propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antimicrobianas, favoreciendo al cuidado de la salud además, posee propiedades antifúngicas que han sido probadas contra diferentes hongos, un ejemplo es el efecto del jugo de brócoli en la inhibición *in vitro* del crecimiento del hongo fitopatógeno *Alternaria* spp., permitiendo la conservación de los alimentos en su etapa de almacenamiento (Mahn, Román, & Reyes, 2016, pág. 96), (Flores, y otros, 2015, pág. 1163). Dentro de otros compuestos que presenta, cabe mencionar a los flavonoides de los cuales el de mayor importancia es la quercetina, usado para tratar problemas inflamatorios y alérgicos por el efecto antioxidante que presenta (Ferraro, Martino, & Bandoni, 2012, págs. 79-80).

1.2 Cultivo *in vitro*

1.2.1 Medio de cultivo

Es un medio artificial que se emplea en el laboratorio para el cultivo *in vitro*, en función a las necesidades de la especie vegetal (metabolismo) para lograr la regeneración exitosa del explante (Sathyanarayana & Verghese, 2007, págs. 29-30). Los componentes del medio de cultivo se clasifican en sales inorgánicas, preparaciones de compuestos naturales, compuestos orgánicos y materiales de soporte inerte (Ngomuo, Mneney, & Ndakidemi, 2014, pág. 1615).

1.2.2 Generalidades

El cultivo *in vitro* se define como el cultivo aséptico de células, tejidos, órganos o plantas bajo condiciones controladas tanto nutricionales como ambientales, en un medio de cultivo artificial con composición química determinada. Esta técnica tiene como finalidad la regeneración de una planta completa a partir de un explante por la

propiedad de totipotencia que presentan las plantas, a través de embriogénesis somática o vía organogénesis, con una reducción de costos por el mantenimiento de un gran número de plantas en un espacio físico reducido (Rangel, Hernández, & Hernández, 2016, págs. 225-226), (Gobbi, Silva, Pombo, & Rodrigues, 2017, págs. 359-360). Además, la técnica ofrece apoyo a los métodos de propagación tradicionales, al preservar especies de interés comercial con alto valor fitogenético o en peligro de extinción (Martínez, y otros, 2015, pág. 369). Durante el cultivo *in vitro* es necesario considerar ciertos factores como: las características de la especie, el balance hormonal, las condiciones nutricionales y la disponibilidad de luz del explante para que la planta se desarrolle correctamente sin problemas fisiológicos (Camargo, y otros, 2015, pág. 2007).

1.2.3 Tipos de cultivo *in vitro*

En el cultivo *in vitro* el proceso de morfogénesis se presenta dos formas: directa denominada organogénesis, permite el proceso de regeneración de órganos directa en meristemas de *novo* o meristemas ya existentes, la otra forma será indirecta (Diro, van Staden, & Bornman, 2004, pág. 498).

Entre las técnicas de cultivo *in vitro* están: a) cultivo de embriones zigóticos que dan origen a embriones de semillas maduros o inmaduros para obtener plantas *in vitro*, b) rescate de embriones híbridos inmaduros de cruces incompatibles (Diro, van Staden, & Bornman, 2004, pág. 498), c) organogénesis indirecta pasa por callo, que es un tejido desdiferenciado, amorfo y coherente que crece de forma desordenada, en concentraciones altas de auxina y bajas de citoquinina origina brotes adventicios (Diro, van Staden, & Bornman, 2004, pág. 500). d) Hibridación somática fusiona protoplastos para crear células híbridas (heterocarión) utiliza PEG (polietilenglicol) e impulsos eléctricos (electroporación) (Vilterhalter, Dragicèvic, & Vilterhalter, 2008,

págs. 22-23), e) Embriogénesis somática, genera embriones en estado temprano iniciando de una célula asexual (diploide o haploide) para obtener un eje de raíz o brote (Loyola & Vázquez, 2006, págs. 87-91), f) Androgénesis, se caracteriza por el ingreso de microsporas (haploides) a la vía de embriogénesis somática obteniendo especies diploides, monoploides y tetraploides (Vilterhalter, Dragicèvic, & Vilterhalter, 2008, pág. 31), g) Tuberización, en la cual los tubérculos son brotes asociados con los estolones, diferenciándose los estolones por la presencia de células diana que le permitirán la división celular y los tubérculos por la elongación celular que aumentaran el grosor de la plántula *in vitro* (Vilterhalter, Dragicèvic, & Vilterhalter, 2008, pág. 32).

El cultivo de yemas (rudimentos de un vástago que forma las axilas de las hojas) y brotes (vástago en estado de desarrollo hasta su crecimiento), obtenidos de plantas jóvenes, que derivan directamente de meristemas organizados con el fin de evitar mutaciones espontáneas, induce la producción brotes largos mayor número de hojas, con ayuda de reguladores de crecimiento en el cultivo *in vitro* como tiazurón (TDZ) (Castilla, 2005, pág. 44).

1.2.4 Aplicaciones del cultivo *in vitro*

La Micropropagación es un avance tecnológico importante que garantiza condiciones asépticas y controladas, permite obtener un gran número de plántulas libres de microorganismos patógenos en poco tiempo (Igarza, Agramonte, Alvarado, & De Fera, 2012, pág. 8). Es importante recalcar que las técnicas biotecnológicas han contribuido a la producción clonal masiva de excelente calidad, gran volumen y uniformidad, en ambientes determinados (Suárez, Jarma, & Avila, 2006, págs. 53-54). Además, la biotecnología vegetal aporta con abundante información para el rescate,

multiplicación y conservación de especies (Montes, Lalama, Echeverría, & Salazar, 2016, pág. 3).

1.3 Componentes del medio de cultivo

1.3.1 Sales minerales

También denominados compuestos inorgánicos son combinaciones aniónicas y catiónicas que intervienen en el control osmótico, reacciones bioquímicas de tipo enzimáticas y funcionan como reguladores de pH (Lanfranco, Pellegrini, & Cattani, 2014, pág. 103). Generalmente en el medio de cultivo estos compuestos no presentan funciones definidas como por ejemplo el Cloruro de sodio (NaCl) que permite regular la osmolaridad en el medio, en algunos casos suelen ser necesarias de manera determinada como en el metabolismo a modo de sales de potasio (K^+), Hierro (Fe^{3+}), Magnesio (Mg^{2+}), en entre otros (Sharry, Adema, & Abedini, 2015, págs. 47-49).

1.3.1.1 Macronutrientes

Los macronutrientes son los elementos que requieren las plantas en elevadas cantidades de 1 g por kg de materia seca (Sadava, Purves, Heller, Orians, & Hillis, 2009), por lo tanto se encuentran en los tejidos vegetales en grandes proporciones contribuyendo a las funciones fisiológicas de la planta entre los macronutrientes más relevantes se tiene al Nitrógeno (N), Fósforo (P), Azufre (S), Magnesio (Mg), Potasio (K) y Calcio (Ca) (Porta, López, & Potch, 2014, pág. 244).

1.3.1.2 Micronutrientes

A diferencia de los macronutrientes las plantas requieren los micronutrientes en bajas cantidades de 100 mg por kg de materia seca (Sadava, Purves, Heller, Orians, & Hillis, 2009), se caracterizan por ser los componentes de las moléculas enzimáticas vegetales, además representan alrededor del 0,01 % de materia seca y su déficit se presenta como

fisiopatías carenciales, entre los micronutrientes más destacados tenemos Cinc (Zn), Cloro (Cl), Níquel (Ni), Molibdeno (Mo), Hierro (Fe^{2+} , Fe^{3+}), Manganeseo (Mn) y Boro (B) (Aguilar Yáñez, 2014, págs. 30-31).

1.3.2 Fuente de carbono

La fuente de carbono óptima se encuentra en un rango de 2-5 %, existen varias fuentes de carbono como: almidón, galactosa, maltosa, lactosa, sacarosa y glucosa. La sacarosa es un componente importante en el cultivo de tejidos vegetales como fuente principal de carbono (Kittiwongwattana & Vuttipongchaiki, 2013, pág. 64), La fuente de carbono mediante el desdoblamiento del carbono induce al crecimiento de plantas, activa el proceso de morfogénesis, formación de raíces adventicias y yemas axilares. Existen fuentes de carbono alternativas que se incorporan en los medios de cultivo, estos son: el extracto de plátano, agua de coco y melaza de caña de azúcar, que aportan con sales inorgánicas, azúcares y fuentes de vitaminas (Saad & Elshahed, 2012, pág. 30).

1.3.3 Reguladores de crecimiento

La combinación de reguladores de crecimiento y condiciones ambientales, actúan en diferentes especies y genotipos con el fin de estimular la micropropagación, a partir de estos factores se controla el proceso de morfogénesis en células vegetales, a su vez permiten el proceso de regeneración de la planta (Diro, van Staden, & Bornman, 2004, pág. 498), la función de los reguladores de crecimiento es intervenir en la respuesta de las células o tejidos cultivados debido a que son fitohormonas que requieren las plantas porque permiten la comunicación celular para coordinar las actividades celulares (Diro, van Staden, & Bornman, 2004); estos se encuentran en dosis únicas o combinadas que ayudan a la formación de brotes, romper la latencia apical y producción de raíces (Ngomuo, Mneney, & Ndakidemi, 2014, pág. 1617).

Los reguladores de crecimiento se clasifican en auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, Poliaminas, jasmonatos, ácido salicílico y brasinoesteroides (Vidales, 2002, pág. 7).

1.3.3.1 Auxinas

Las auxinas se emplearon en el cultivo de tejidos vegetales para la formación y aumento de raíces, permiten el crecimiento, separación y elongación celular, estimulan la brotación de callos y pueden inducir a embriogénesis somática para permitir el crecimiento a partir de la zona apical del brote (Ngomuo, Mneney, & Ndakidemi, 2014, pág. 1617). Las auxinas cambian su función de acuerdo a su translocación por el tejido vegetal y el metabolismo que realizan, cabe resaltar la propiedad fotosensible ya que en el laboratorio las soluciones de auxinas se conservan estables a una temperatura de 4 °C almacenadas en frascos ámbar (Kadhimi, Alhasnawi, Mohamad, Yusoff, & Zain, 2014, pág. 487).

Existen varios tipos de auxinas utilizadas en los medios de cultivo en el área de biotecnología vegetal, entre las cuales están las de origen natural como el ácido indol-3-acético (IAA) y las de origen sintético destacando el ácido naftaleno-acético (NAA); ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); ácido-3-indolbutírico (IBA); 2,4,5-tricloro-ácido fenoxiacético (2,4,5 T); ácido 4-clorofenoxiacético (4-CPA); ácido p-clorofenoxiacético pCPA; ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-picolínico (picloram) y ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (dicamba) (Saad & Elshahed, 2012).

1.3.3.2 Citoquininas

Las citoquininas son reguladores de crecimiento relacionados con la morfogénesis y el desarrollo, debido a que estimulan la división celular con formación de órganos, el desarrollo de brotes y promoviendo el crecimiento lateral, haciendo posible la regeneración de plantas completas (Aros, Vásquez, Rivas, & Loreto, 2017, págs. 95-

96). Además, según Hwan Kim & Sivanessan (2016, págs. 2-3), las citoquininas se caracterizan por promover el movimiento de nutrientes y permiten el crecimiento principalmente de tallos y raíces.

1.3.3.3 Giberelinas

Las giberelinas a diferencia de otros fitoreguladores, se encuentran de forma natural en las plantas y se caracterizan por promover la elongación de los entrenudos por alargamiento celular y crecimiento meristemático, además estimulan la formación de tallos y raíces adventicias e inducen la dormancia en semillas (Sharry, Adema, & Abedini, 2015). En cultivo *in vitro* la giberelina más empleada para propagación es el ácido giberélico (AG₃) (Sharry, Adema, & Abedini, 2015, pág. 47). El ácido giberélico actúa como una hormona natural de crecimiento, encontrándose en bajas concentraciones en la mayoría de las plantas, se encuentra mayormente en frutos en desarrollo y semillas inmaduras; sin embargo, es empleado para aumentar el número de flores debido a que estimula el proceso de floración (Díaz, Henao, & Ramírez, 2013, págs. 359-360).

1.3.4 Vitaminas y aminoácidos

Las vitaminas son compuestos orgánicos que requieren las plantas para el crecimiento y funcionamiento del metabolismo vegetal celular, dentro de las vitaminas más relevantes en el cultivo *in vitro* se encuentran la Piroxidina, el Ácido Nicotínico y la Tiamina como parte del medio de cultivo (Liñán Carral, 2015). Además, otro componente importante del medio son los aminoácidos que representan la fuente nitrógeno orgánico, los aminoácidos mayormente utilizados en el cultivo *in vitro* son: caseína hidrolizada, adenina y Glutamina (Liñán Carral, 2015, pág. 173).

1.3.5 Agentes Solidificantes

Un componente característico del medio del cultivo que le otorga aspecto de gel es el agar, su estructura química constituye de un polisacárido que se extrae de las algas marinas, que puede modificar el medio a un estado sólido o semisólido; está formado por macroelementos y oligoelementos como magnesio y calcio, el agar presenta características físicas sobresalientes como ser miscible en agua, su temperatura de fusión es de 60-100 °C, la temperatura de solidificación 45°C, en general el agar gelifica a una concentración de 0,8-1,0 %, un aspecto muy útil es que no presenta reacción al combinarlo con el medio de cultivo ni altera las funciones de las enzimas, cabe señalar que la dureza del medio influye en el crecimiento de los explantes. Entre las variedades de agar comercial se encuentran: agarosa, goma gellan, agar y bactoagar (Saad & Elshahed, 2012).

1.3.5.1 pH del medio nutritivo

El pH permite el crecimiento y desarrollo de los explantes, a su vez gelifica el medio de cultivo a un punto óptimo de 5,7 cuando se mezcla de forma adecuada. El rango recomendado en cultivo de tejido de plantas en los medios son generalmente 5,6 a 5,8 aunque existen diferentes rangos de acuerdo a la especie (Roca & Mroginsky, 2000, pág. 70). Se toma a consideración que una alta acidez (debajo de 4,5) causa inhibición en el crecimiento de plantas *in vitro* debido a la precipitación de fosfato, sales de iones y reguladores de crecimiento (Msogoya, Maerere, Nzogela, & Kusolwa, 2008, págs. 488-489).

1.4 Medio Murashige y Skoog

El medio Murashige y Skoog (M&S) es un medio nutritivo de componentes definidos que se realizó originalmente para el cultivo de Tabaco (*Nicotiana tabacum*), pero presentó buenos resultados para un gran número de especies vegetales debido a que

está suplementado con vitaminas, reguladores de crecimiento y fuente de carbono para fines específicos dependiendo del objetivo de estudio (Sathyanarayana & Verghese, 2007, págs. 29-30). Los macronutrientes y micronutrientes del medio M&S, se caracterizan por permitir el crecimiento y diferenciación de células o tejidos, de tal forma que brindan los requerimientos necesarios a la especie vegetales, con una concentración estándar de 4,3 g/L (Probiotek, 2017), (Ngomuo, Mneney, & Ndakidemi, 2014, pág. 1615).

1.5 Fases de cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* presenta una serie de etapas desde la elección de la planta madre hasta la adaptación de la plántula a campo, a continuación se muestran las diferentes fases:

1.5.1 Fase 0: Fase preparativa

Es la primera etapa del cultivo *in vitro* donde se selecciona la planta madre o donadora en función a características fitosanitarias y fisiológicas, para posteriormente prepararla para las condiciones *in vitro* (García, Quiroz, & Carrasco, 2010, págs. 5-6). Durante esta fase es de relevancia tener en cuenta factores como estado fisiológico y ontogénico, tipo de explante, temporada de colecta y estado de sanidad, estos influyen directamente en la calidad del explante elegido, por lo tanto es recomendable colocar a la planta madre en invernadero para el control de condiciones de luz, humedad, temperatura y riego, con la finalidad de reducir los niveles de contaminación tanto bacteriana como fúngica y lograr un adecuado establecimiento *in vitro* (Olmos, Luciani, & Galdeano, 2012, págs. 353-355).

1.5.1.1 Protocolo de desinfección

Es importante para el establecimiento *in vitro* de la especie debido a que la presencia de contaminantes (microorganismos) afectan la viabilidad de los explantes. Los explantes son estructuras u hojas jóvenes de plantas de semilla o vivero que poseen un potencial de regeneración (Calderón, Restrepo, & Urrea, 2011, pág. 20), por ejemplo; yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. (García, Meza, & Ocampo, 2015, págs. 77-78).

En el protocolo de desinfección se experimenta con los explantes, se emplea agua estéril, etanol, productos a base de cloro como hipoclorito de sodio, entre otros en concentraciones y tiempos específicos para cada especie con la finalidad de evitar contaminación (IAEA, 2004, págs. 11-12).

1.5.2 Fase 1: Fase de establecimiento *in vitro*

Es un proceso dentro del cultivo *in vitro* que consiste en la desinfección de los explantes. Para la desinfección de semillas se debe esterilizar en la superficie y colocar en el medio de cultivo, ya que la semilla posee una reserva alimenticia denominada endospermo además de carbohidratos y nutrientes que ayudan a la germinación, en otros casos se presentan semillas con poco endospermo, pero en ambos casos se necesita añadir nutrientes adicionales para permitir el desarrollo de las semillas (De Jesús & Cano, 2012, págs. 18-19).

El cultivo de semillas se añaden niveles específicos de reguladores de crecimiento, se siembran varias semillas por frasco de vidrio se coloca en incubación a una temperatura adecuada de 19 °C a 27 °C, humedad con un promedio de 70 %, la intensidad lumínica se establece en un rango de 1500 lux y 5000 lux (Cárdenas, Pacheco, & Vanzela, 2016, pág. 11), (Pérez Martínez, 2015, pág. 156).

1.5.3 Fase 2: Fase de multiplicación

Etapa que permite cultivar plántulas para multiplicar brotes de forma repetida y si la especie lo requiere, se realizará un subcultivo *in vitro* tomando en cuenta el índice de multiplicación para evitar la pérdida de estabilidad genética de la planta (IAEA, 2004, pág. 8). Un explante en el proceso de multiplicación presenta mayores y menores cantidades de plántulas (tasa de multiplicación) si existe exceso en la tasa se observará modificaciones del genotipo, además existen estudios que afirman que la tasa de multiplicación depende de concentraciones de reguladores de crecimiento (Oliveira, Costa, & Scherwinski, 2008, pág. 1431).

1.5.4 Fase 3: Fase de elongación

Representa una fase extra en el cultivo *in vitro* ya que en ciertos cultivos es opcional, generalmente se requiere de esta fase cuando los brotes multiplicados no presentan un tamaño adecuado o son de longitud pequeña y como consecuencia suelen generar malos resultados durante la fase de enraizamiento o durante la fase de adaptación a sustrato, debido a que las plántulas pueden resultar de baja calidad, por lo tanto, la fase de elongación permite estimular el crecimiento de plántulas con problemas de desarrollo a través de la adición de ácido giberélico en el medio de cultivo (Navroski, Reiniger, & Pereira, 2015, págs. 79-81).

1.5.5 Fase 4: Fase de enraizamiento

Según Fernández, Díaz, & González (2016), el proceso de enraizamiento *in vitro* hace referencia a la etapa fisiológica durante la cual las plántulas desarrollan raíces en laboratorio, para que sirvan como soporte, anclaje y medio de absorción de nutrientes y agua para su posterior traslado a campo o invernadero.

Durante la etapa de enraizamiento *in vitro* se modifica el medio de cultivo para inducir a la formación de raíces adventicias o auxiliares, al alterar la composición nutricional

y adicionar reguladores de crecimiento, generalmente se emplean auxinas para la emergencia y desarrollo de raíces después de pasar por diferentes subcultivos (Reyes, y otros, 2016, págs. 125-127).

1.5.6 Fase 5: Fase de aclimatación

La aclimatación es la última fase del cultivo *in vitro*, durante esta etapa se produce la adaptación al medio externo. Fisiológicamente inicia con la transferencia de un estado heterotrófico a un autotrófico, debido a que las plántulas *in vitro* presentan el sistema estomático atrofiado con bajo desarrollo de cutícula causado por la alta humedad al interior del contenedor, además presenta escasa capacidad fotosintética por el bajo contenido de clorofílico; por lo tanto, durante la aclimatación se evita que las plántulas sean sometidas a condiciones de estrés o muerte por la humedad relativa baja y los altos niveles de luz que se generan en campo (Ravanfar, Aziz, & Shabanimofrad, 2013, págs. 1-2), mediante el adecuado control de dichas condiciones es recomendable colocar a las plántulas en cámaras de crecimiento o instalaciones de invernadero con humedad relativa y temperatura controladas, para la adaptación progresiva de la plántula que ha sido colocada en sustratos previamente desinfectados (Olmos, Luciani, & Galdeano, 2012, págs. 353-355).

1.5.6.1 Sustratos

Ante la necesidad de trasladar en buen estadio las plantas hasta adaptarlas en campo surgen los sustratos, estos en la fase de aclimatación favorecen al desarrollo de la parte aérea como radicular de la planta favoreciendo al aumento de tamaño y grosor (Trinidad, Vargas, Aldrete, López, & Fierros, 2015). Mejora las propiedades físicas tales como: retención de agua, aireación, granulometría, densidad aparente, drenaje y porosidad al 70 %. Propiedades químicas: pH, nivel nutricional y salinidad. Entre los sustratos que se comercializan se tienen: mezcla de cascarilla con café, turba, agrolita,

vermiculita, bentonita, humus y fibra de coco (Gayosso, Borges, Villanueva, Estrada, & Garruña, 2016).

1.6 Fotosíntesis y Fluorescencia

La fotosíntesis es un proceso biológico para transformar la energía lumínica en energía química en estructuras llamadas cloroplastos debido a que estos organelos vegetales poseen moléculas de clorofila (pigmentos clorofílicos) que son sensibles a la energía lumínica la cual es usada para el proceso de fotosíntesis (Valdés & Caballeros, 2015). Los pigmentos clorofílicos en el ámbito ecofisiológico proporcionan información de estrés y productividad, entre los pigmentos clorofílicos resaltan la clorofila a, clorofila b y carotenoides al presentar funciones similares en el proceso de fotosíntesis como: captar luz, relacionarse con complejos externos captadores de energía del PSI y PSII respectivamente, canalizar la energía y transportar energía a los centros de reacción. Tanto la clorofila a como la b se denominan complejo antena LHC (Light Harvesting Complex) (Solarte, Moreno, & Melgarejo, 2010). Además los carotenoides (pigmentos accesorios) están constituidos químicamente por dobles enlaces conjugados que repelen el exceso de luz absorbida por los pigmentos (Solarte, Moreno, & Melgarejo, 2010). Por lo tanto, los niveles de pigmentos fotosintéticos influyen de forma proporcional en la capacidad fotosintética de la hoja limitando o favoreciendo el proceso fotoquímico de las plantas (González, Perales, & Salcedo, 2008).

En la mayoría de las plantas el proceso de fotosíntesis se presenta en dos fases: una fase en la cual se produce la captación de la energía lumínica mediante las moléculas clorofílicas y ocurre una reacción de oxidación del agua para generar hidrógeno y oxígeno el cual es liberado al ambiente, a esta fase se la conoce como Fase Lumínica y una Fase Oscura en la cual ocurre la captación del CO₂ para unirse con el hidrógeno y otros compuestos obtenidos en la fase previa, para generar glucosa un compuesto

orgánico que será sintetizado por la planta y lo utilizará como alimento (Valdés & Caballeros, 2015, págs. 39-43).

A su vez, la fluorescencia es un parámetro que mantiene estrecha relación con la clorofila, debido a que, una vez que la energía lumínica es absorbida pueda tomar tres rutas diferentes, la primera cuando la energía es trasladada al fotosistema I y fotosistema II y a su vez es llevada a los centros de reacción donde se produce la fotosíntesis; del 3-5 % de la energía absorbida no es usada en el proceso de fotosíntesis de tal forma que es remitida a manera de fluorescencia y la otra parte del 95-97 % se disipa a manera de calor, por lo tanto, al medir la fluorescencia permitirá obtener información de la eficiencia fotosintética vegetal (Jiménez, Alvarado, & Balaguera, 2015, págs. 150-151).

1.6.1 Eficiencia fotosintética

La medición de la eficiencia fotosintética es una técnica que permite determinar los niveles de estrés tanto biótico como abiótico en plantas, y daños asociados al mismo, a través del análisis de la absorción y empleo de la energía lumínica para la emisión de una fluorescencia determinada, resultando una técnica adecuada y no invasiva (Melo, Souza, & Cunha, 2017, págs. 232-233), a diferencia de otras técnicas que implican la destrucción o corte del tejido vegetal para el análisis de las muestras, de manera que la planta se ve afectada una sección o completamente, por ejemplo la evaluación del estado de desarrollo y estado fisiológico vegetal a través de espectroscopia de infrarrojo cercano o la medición de la fluorescencia por medio de la técnica de fluorescencia inducida con láser que provoca la destrucción de la muestra, por lo tanto la medición de eficiencia fotosintética mediante un fluorómetro portátil no resulta invasiva al no alterar el sistema vegetal sin provocar la muerte del explante (Quintero & Correa, 2010). Al mismo tiempo es una herramienta que permite

esclarecer los mecanismos fotosintéticos y las modificaciones que se producen en las plantas por el estrés causado por diferentes factores, que provocan cambios en los centros de reacción del fotosistema (PSII) como un deficiente transporte electrónico en los fotosistemas y daños en los centros de reacción del PSII (Silveira, Santos, Ferreira, Santos, & Silva, 2017, págs. 3-4). Por lo tanto, la eficiencia fotosintética permite identificar cualquier alteración fisiológica que influya en el funcionamiento del fotosistema II (PSII); permite estimar el estrés sufrido por la planta, mediante el control de la fluorescencia emitida que se obtiene a partir de la F_0 (fluorescencia mínima) que representa el nivel mínimo alcanzado por la fluorescencia al estar expuesto a la luz de tal forma que se encuentren los centros de reacción del PSII abiertos (permiten el paso de la luz), de manera que la fluorescencia aumente hasta un nivel en que se asume que los centros de reacción del PSII se cierran dando la F_m (fluorescencia máxima), obteniendo la F_v (fluorescencia variable) como resultado de la diferencia entre F_m con F_0 , por lo tanto, la relación F_v/F_m representa la proporción de la fluorescencia variable en relación a la fluorescencia máxima (Garrido, 2016). La fluorescencia de la clorofila es una de las técnicas más populares en la fisiología de las plantas, tiene la facilidad de proveer información detallada sobre el estado del fotosistema II (PSII) a un coste relativamente bajo (Murchie & Lawson, 2013, págs. 3983-3998). El estado del PSII está determinado por la fluorescencia emitida, debido a que una eficiencia fotosintética entre 0,75 a 0,86 no representa estrés y por ende el PSII se encuentra en perfectas condiciones, mientras que un valor entre 0,69 a 0,74 representa zonas con estrés bajo y finalmente eficiencias bajo 0,69 representan alto estrés y daños en el PSII (Melo, Souza, & Cunha, 2017).

Capítulo 2

2 Metodología

2.1 Localización

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la carrera de Biotecnología de los Recursos Renovables de la Universidad Politécnica Salesiana, ubicado en la provincia de Pichincha, del cantón Quito, Parroquia el Girón. Las plantas se mantuvieron en el cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas con una temperatura entre 20 - 25 °C y una humedad relativa entre 43 y 60 %.

2.2 Evaluación de sales M&S en dos variedades de brócoli.

2.2.1 Elección del explante y Protocolo de desinfección

El material inicial empleado fueron semillas de dos variedades de brócoli Top Head F-1 y Waltham 29, que se adquirieron en la provincia de Tungurahua cantón Ambato y la provincia de Pichincha cantón Quito, respectivamente.

En el protocolo de desinfección los explantes seleccionados fueron esterilizados superficialmente durante 2 minutos en Etanol al 80 %, a continuación se sumergieron en Hipoclorito de Sodio (NaClO) al 30 % con tres gotas de Tween 20 en agitación constante por 18 minutos. Finalmente, se enjuagaron 4 veces consecutivas en agua destilada estéril, de acuerdo al procedimiento realizado por Ravanfar, Aziz & Shabanimofrad (2013).

A continuación, se desinfectó la cámara de flujo laminar con alcohol al 70 % y exposición a la luz ultravioleta (UV) durante 15 min, junto al instrumental a emplearse. Concluido el proceso de desinfección se efectuó la siembra.

2.2.2 Fase de Introducción

El medio de cultivo para esta fase fue Murashige y Skoog (M&S). Se evaluaron tres concentraciones de sales (100 %, 50 % y 25 %) para seleccionar la concentración óptima en semillas de brócoli. Adicionalmente el medio fue enriquecido con 20 g/L de sucrosa, 1 g de carbón activado y 5 g/L de agar, se trabajó con un pH entre 5,6 y 5,8. A continuación los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave durante 30 minutos a 121 °C y 15 PSI.

2.2.2.1 Factores de estudio

- a) Tres concentraciones de sales M&S: M1 (100 %), M2 (50 %) y M3 (25 %)
- b) Dos variedades de Brócoli: V1(Top Head F-1) y V2 (Waltham 29)

2.2.2.2 Tratamientos

Para determinar el mejor tratamiento, se sembraron semillas de brócoli en medio M&S con concentraciones de sales al 100 % (M1), 50 % (M2) y 25 % (M3), con dos variedades de brócoli que fueron Top Head F-1 (V1) y Waltham 29 (V2), para esto los tratamientos se codificaron como se muestra en la tabla 1:

Tabla 1.

Tratamientos para la evaluación de las concentraciones de sales M&S al 100 %, 50 % y 25 % en semillas de Brócoli durante la fase de introducción y multiplicación *in vitro*

Tratamiento	Interacción variedad de brócoli y concentración de sales M&S
M1V1	Variedad Top Head F-1 cultivada en medio M&S al 100 %
M2V1	Variedad Top Head F-1 cultivada en medio M&S al 50 %
M3V1	Variedad Top Head F-1 cultivada en medio M&S al 25 %
M1V2	Variedad Waltham 29 cultivada en medio M&S al 100 %
M2V2	Variedad Waltham 29 cultivada en medio M&S al 50 %
M3V2	Variedad Waltham 29 cultivada en medio M&S al 25 %

Nota: Elaborado por los autores (2018).

2.2.2.3 Unidad experimental

La unidad experimental estuvo conformada por contenedores de plástico de 6,5 cm de longitud y 7,5 cm de diámetro; con 30 mL de medio de cultivo, sembrado con 6 semillas de Brócoli.

2.2.2.4 Análisis estadístico

2.2.2.4.1 Diseño experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) dispuesto en un arreglo factorial 3×2 (3 concentraciones de sales M&S por 2 variedades). Se efectuaron cuatro repeticiones para cada tratamiento.

2.2.2.4.2 Análisis para prueba de normalidad

Se empleó el análisis de Shapiro Wilks para determinar las variables paramétricas y las variables no paramétricas y establecer el análisis de estadístico apropiado.

2.2.2.4.3 Análisis de varianza, Kruscal Wallis y análisis funcional

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias significativas en variables paramétricas y de Kruscal Wallis para variables no paramétricas, el análisis funcional se llevó a cabo con la prueba significativa de Tukey al 5 % para los factores de estudio y sus interacciones con ayuda del programa software INFOSTAT.

2.2.2.5 Variables y métodos de evaluación

2.2.2.5.1 Porcentaje de germinación

Se reportó la germinación de las semillas cada 7 días mediante la observación visual hasta los 15 días a partir de la siembra. Se determinó la presencia germinativa (emisión de la radícula) en relación a la población total de cada tratamiento por 100.

2.2.2.5.2 Número de Hojas

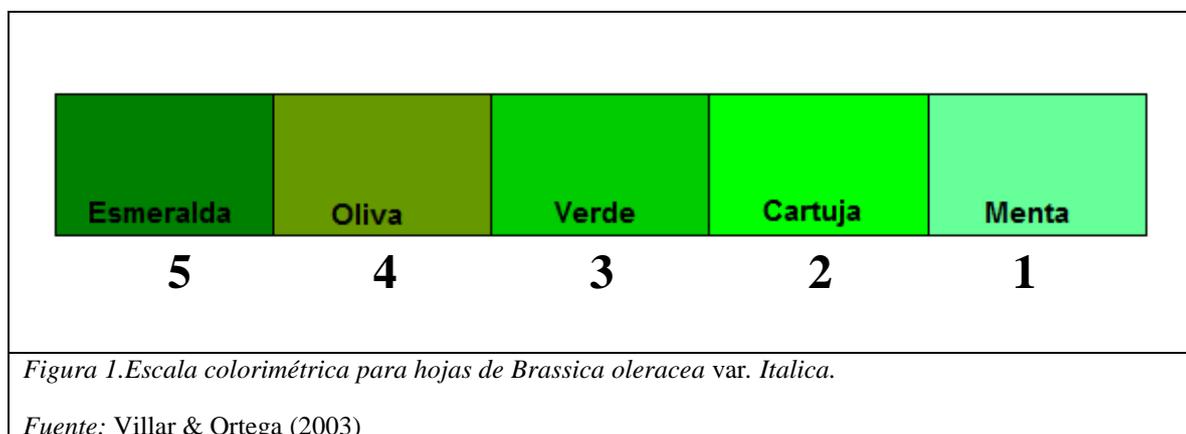
Se contabilizó la cantidad de hojas por explante cada 7 días, a través de la observación visual hasta el final de esta fase.

2.2.2.5.3 Longitud del tallo

Se midió la longitud del explante con una regla, semanalmente durante 15 días, la medición fue realizada en centímetros (cm) con una regla desde la base del tallo hasta la yema terminal del explante.

2.2.2.5.4 Color de las hojas

Se midió el color de las hojas con una escala cualitativa dando valores a los colores por medio de una escala colorimétrica mediante la comparación visual al final de la fase, se calificó la ausencia de color con 0 y la mayor coloración con 5 (Esmeralda), siendo los colores 4 (oliva) y 5 (esmeralda) óptimos para la variable color de hoja (Figura 1).



2.2.2.5.5 Consistencia del Tallo

Se determinó la presencia de vitrificación del explante al final de la fase, se midió con una escala cualitativa de presencia y ausencia de vitrificación, asignándole valores de 10 a la presencia, 5 a la ausencia y con 0 a la ausencia del explante.

2.2.2.5.6 Diámetro óptimo del tallo

Se realizó la observación del diámetro óptimo del tallo al finalizar la fase, se tomó como parámetro final para determinar el paso a la fase siguiente, se valoró con 10 al tallo grueso (mayor o igual a 2 mm), con 5 al tallo delgado (menor a 2 mm) y con 0 a la ausencia del explante.

2.2.3 Fase de Multiplicación:

Los explantes provenientes de la fase I, fueron cultivados en un nuevo medio basal M&S con concentración de sales de 100 %, 50 % y 25 %. El medio se suplementó con 5,0 g/L de Agar, 1 g/L de carbón activado, 20 g/L de sucrosa y una concentración fija de 0,2 mg/L de AIA (Ácido Indol Acético) (Dănăilă, Rosu, Ionica, Visan, & Dobrinoiu, 2012). La fase se llevó acabo en un tiempo de 15 días, seguido de un subcultivo baja las mismas condiciones durante 20 días.

2.2.3.1 Factores de estudio

- a) Tres concentraciones de sales M&S: M1 (100 %), M2 (50 %) y M3 (25 %)
- b) Dos variedades de Brócoli: V1(Top Head F-1) y V2 (Waltham 29)

2.2.3.2 Tratamientos

Los tratamientos se realizaron de acuerdo a lo detallado en la tabla 1.

2.2.3.3 Unidad experimental

La unidad experimental estuvo conformada por contenedores de plásticos de 9 cm de longitud y 5 cm de diámetro; con 30 mL de medio de cultivo, con 2 plántulas de Brócoli.

2.2.3.4 Análisis estadístico

2.2.3.4.1 Diseño experimental

Se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA) dispuesto en un arreglo factorial 3×2 (3 concentraciones de sales M&S por 2 variedades). Se realizó doce repeticiones para cada tratamiento.

2.2.3.4.2 Análisis para prueba de normalidad

Se empleó el análisis de Shapiro Wilks para determinar las variables paramétricas y las variables no paramétricas, y establecer el análisis estadístico apropiado.

2.2.3.4.3 Análisis de varianza, Kruscal Wallis y análisis funcional

Se empleó el análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias significativas en variables paramétricas y de Kruscal Wallis para variables no paramétricas, el análisis funcional se llevó a cabo con la prueba significativa de Tukey al 5 % con ayuda del programa software INFOSTAT.

2.2.3.5 Variables y métodos de evaluación

2.2.3.5.1 Longitud del tallo

Se midió la longitud del explante en centímetros (cm) con papel milimetrado estéril antes de ingresar a la fase de multiplicación y al finalizar la fase, desde la base del tallo hasta la yema terminal.

2.2.3.5.2 Porcentaje de Brotación

Se evaluó el porcentaje de brotación al final de la fase, se calificó con 100 a los dos explantes brotados, 50 solo un explante brotado y con 0 la ausencia de brotación.

2.2.3.5.3 Diámetro óptimo del tallo

Se realizó la observación del diámetro óptimo del tallo al finalizar la fase, se tomó como parámetro final para determinar el paso a la fase siguiente, se valoró con 10 al

tallo grueso (mayor o igual a 2 mm), con 5 al tallo delgado (menor a 2 mm) y con 0 a la ausencia del explante.

2.3 Fase de aclimatación: Evaluación de sustratos

Se tomaron al azar *vitroplantas* de brócoli procedentes de la fase de multiplicación, mismas que fueron adaptadas a dos diferentes sustratos estériles para ser evaluadas. Las plantas fueron regadas con agua destilada estéril tres veces por semana, durante 28 días de evaluación.

2.3.1 Factores de estudio

- a) Dos Sustratos para adaptación: S1 (50 % de turba + 50 % de bentonita) y S2 (75 % de turba y 25 % de humus).
- b) Dos variedades de Brócoli: V1(Top Head F-1) y V2 (Waltham 29)

2.3.2 Tratamientos

Para seleccionar los sustratos óptimos, las *vitroplantas* de brócoli fueron sembradas en dos sustratos diferentes que fueron turba con bentonita (S1) y turba con humus (S2), con dos variedades de brócoli que fueron Top Head F-1 (V1) y Waltham 29 (V2), para eso los tratamientos se codificaron como se muestra en la tabla 2:

Tabla 2.

Tratamientos para aclimatación de dos variedades de Brócoli en dos sustratos diferentes.

Tratamiento	Interacción sustrato- variedad
S1V1	Variedad Top Head F-1 adaptada a Turba 50 % (P/P) + bentonita 50 % (P/P).
S2V1	Variedad Top Head F-1 adaptada a Turba 75 % (P/P) + Humus 25 % (P/P).
S1V2	Variedad Waltham 29 adaptada a Turba 50 % (P/P) + bentonita 50 % (P/P).
S2V2	Variedad Waltham 29 adaptada a Turba 75 % (P/P) + Humus 25 % (P/P).

Nota: Elaborado por los autores (2018).

2.3.3 Unidad experimental

La unidad experimental a utilizarse fue una bandeja plástica de 22 cm de longitud 22 cm de diámetro, con 130 g de sustrato, con seis *vitroplantas* de Brócoli.

2.3.4 Análisis estadístico

2.3.4.1 Diseño experimental

Se realizó un Diseño Completamente al azar (DCA) dispuesto en un arreglo factorial 2×2 (2 sustratos por 2 variedades). Se efectuó tres repeticiones para cada tratamiento.

2.3.4.1.1 Análisis para la prueba de normalidad

Se empleó el análisis de Shapiro Wilks para determinar las variables paramétricas y las variables no paramétricas y establecer el análisis estadístico apropiado.

2.3.4.1.2 Análisis de varianza, Kruscal Wallis y análisis funcional

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias significativas en variables paramétricas y de Kruscal Wallis para variables no paramétricas, el análisis funcional se llevó a cabo con la prueba significativa de Tukey al 5 % con ayuda del programa software INFOSTAT.

2.3.5 Variables y métodos de evaluación

2.3.5.1 Longitud del tallo

Se midió la longitud de la plántula en centímetros (cm) con ayuda de una regla antes de ingresar a la fase de aclimatación y al finalizar la fase, desde la base del tallo hasta la yema terminal.

2.3.5.2 Porcentaje de enraizamiento

Se contabilizó el número de plantas que enraizaron, en relación a la población total de cada tratamiento por 100, la evaluación se realizó al final de la fase.

2.4 Evaluación de la eficiencia fotosintética

La actividad del fotosistema II se midió con el empleo del Flurómetro OS30p +. Se tomó una hoja del explante de Brócoli que fue colocada en una pinza con su abertura cerrada, para impedir el paso de la luz, durante 5 minutos. A continuación, se abrió el paso de luz para colocar en el lector y se midió la fluorescencia de la clorofila (Fv/Fm).

2.4.1 Fase de multiplicación

Para la evaluación de la eficiencia fotosintética los explantes de brócoli fueron evaluados según los factores de estudio y la unidad experimental detallados en la fase de multiplicación en los literales 2.2.3.1 y 2.2.3.3, los tratamientos se evaluaron según lo establecido en la tabla 1. Se midió la eficiencia fotosintética antes de ingresar a la fase de multiplicación, en subcultivo a los 15 días y al finalizar la fase a los 20 días.

2.4.1.1 Análisis de varianza y análisis funcional para la eficiencia fotosintética

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias significativas y el análisis funcional se llevó a cabo con la prueba significativa de Tukey al 5 % con ayuda del programa software INFOSTAT.

2.4.2 Fase de aclimatación

Para la evaluación de la eficiencia fotosintética las *vitroplantas* de brócoli se analizaron según los factores de estudio y la unidad experimental detallados anteriormente en la fase de aclimatación, mencionado en los literales 2.3.1 y 2.3.3 respectivamente, los tratamientos fueron los establecidos en la tabla 2. Se midió la actividad del fotosistema II de las hojas en cada tratamiento cada 7 días en un periodo de 28 días.

2.4.2.1 Análisis de varianza y análisis funcional para la eficiencia fotosintética

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias significativas y el análisis funcional se llevó a cabo con la prueba significativa de Tukey al 5 % con ayuda del programa software INFOSTAT.

2.4.2.2 Método de análisis de la actividad fotosintética

La variable de actividad fotosintética (F_v/F_m) se determina a partir de ciertos parámetros tales como el nivel de fluorescencia mínima (F_0) que representa los centros de reacción del fotosistema II (PSII) en estado abierto por adaptación de las hojas a la oscuridad, seguido de una exposición a la luz hasta alcanzar el nivel de fluorescencia máxima (F_m) representado por los centros de reacción en estado cerrado. La fluorescencia variable (F_v), se calcula mediante la diferencia de la fluorescencia mínima con la fluorescencia máxima (F_0-F_m), finalmente el resultado de la fluorescencia de la clorofila mediante la relación de la fluorescencia variable con la máxima fluorescencia (F_v/F_m), es el valor obtenido como fluorescencia de la clorofila (Murchie & Lawson, 2013, págs. 3984-3985).

Capítulo 3

3 Resultados y discusión

3.1 Evaluación de sales M&S en dos variedades de brócoli.

3.1.1 Fase de introducción

Se realizó un análisis de los valores obtenidos en función de los seis tratamientos. Se evaluó el porcentaje de germinación, longitud de tallo y número de hojas semanalmente, mientras que las variables color de hoja, consistencia del tallo y diámetro óptimo del tallo se evaluaron al finalizar la fase, en función a estas últimas se determinó el paso de las plántulas a la siguiente fase (Tabla 3).

Tabla 3.

Análisis estadístico para las variables porcentaje de germinación, longitud del tallo, color de hoja, consistencia del tallo, número de hojas y diámetro óptimo del tallo, en *vitroplantas* de Brócoli introducidas al medio M&S.

Tipo de variable	Paramétrica				No paramétrica	
	Germinación (%)	Long. Tallo (cm)	Color Hoja	Consistencia del tallo	Nº Hojas	Diám. óptimo del tallo
F.V						
Tratamiento	0,5640 ^{ns}	0,5296 ^{ns}	0,0668 ^{ns}	0,2767 ^{ns}	0,3327 ^{ns}	0,8960 ^{ns}
Variedad	>0,9999 ^{ns}	0,2083 ^{ns}	0,8270 ^{ns}	0,5560 ^{ns}	0,3681 ^{ns}	0,8404 ^{ns}
Sales	0,1643 ^{ns}	0,6889 ^{ns}	0,0095**	0,0666 ^{ns}	0,1409 ^{ns}	0,4674 ^{ns}
Sales* Variedad	>0,9999 ^{ns}	0,4223 ^{ns}	0,8232 ^{ns}	0,8876 ^{ns}	0,3327 ^{ns}	0,8960 ^{ns}

* Diferencia significativa ($p < 0,05$), ** Diferencia altamente significativa ($p < 0,01$), ns - No significativo. Nota: Elaborado por los autores (2018).

Para las variables porcentaje de germinación, longitud del tallo, consistencia del tallo, número de hojas y diámetro óptimo del tallo, se determinó que no existió diferencia entre los tratamientos ($p > 0,05$), a su vez no presentaron diferencias en las fuentes de variación como: variedad, sales e interacción (Tabla 3). Sin embargo, para la variable color de hoja se encontró alta diferencia significativa, únicamente para la fuente de variación que respecta a la concentración de sales ($p \leq 0,01$) (Tabla 3).

Tabla 4.

Promedios \pm error estándar para las variables porcentaje de germinación, longitud del tallo, color de hoja, consistencia del tallo, número de hojas y diámetro óptimo del tallo al evaluar las concentraciones de sales en explantes de brócoli introducidas al medio, a los 15 días de evaluación.

Sales	Germinación (%)	Long. Tallo (cm)	Color Hoja	Consistencia tallo	Nº Hojas	Diám. Óptimo tallo
M1	95,75 \pm 1,74 a	4,44 \pm 0,24 a	3,13 \pm 0,33 b	5,38 \pm 0,36 a	2,50 \pm 0,53 a	9,25 \pm 0,89 a
M2	100,0 \pm 1,74 a	4,50 \pm 0,24 a	4,38 \pm 0,33 a	5,00 \pm 0,36 a	2,50 \pm 0,53 a	10,00 \pm 0,89 a
M3	100,0 \pm 1,74 a	4,23 \pm 0,24 a	2,88 \pm 0,33 b	6,25 \pm 0,36 a	2,00 \pm 0,53 a	10,00 \pm 0,89 a

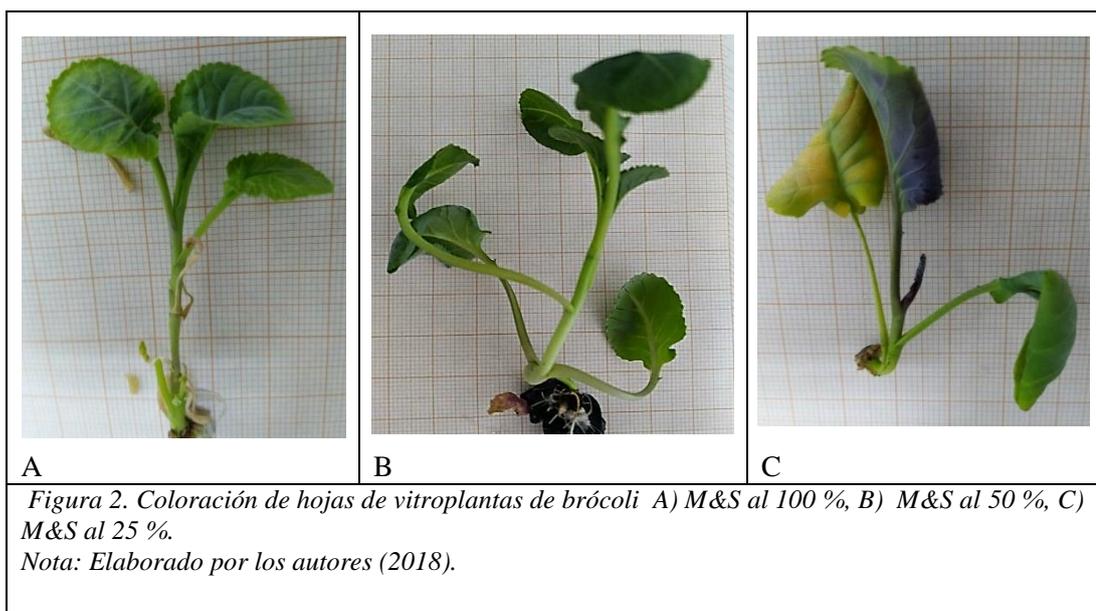
Nota: Promedios de letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($\leq 0,05$). Elaborado por los autores (2018).

En la variable porcentaje de germinación las tres concentraciones de sales fueron adecuadas para el establecimiento *in vitro* de brócoli con 96 a 100 % de *vitroplantas* germinadas, lo que coincide con Yussof, Wafa, & Taha (2013, págs. 179-180), quienes probaron diferentes concentraciones de M&S para la germinación de semillas de Brócoli y obtuvieron buenos resultados en todos los tratamientos al obtener múltiples brotes para la producción a gran escala, por lo tanto durante la germinación de semillas de brócoli no influye notablemente la concentración de sales M&S.

En la variable longitud del tallo las tres concentraciones de sales fueron adecuadas con un valor promedio entre 4,23 a 4,50 cm por explante, por lo tanto los tratamientos empleados permitieron el crecimiento del tallo sin existir diferencia entre concentraciones.

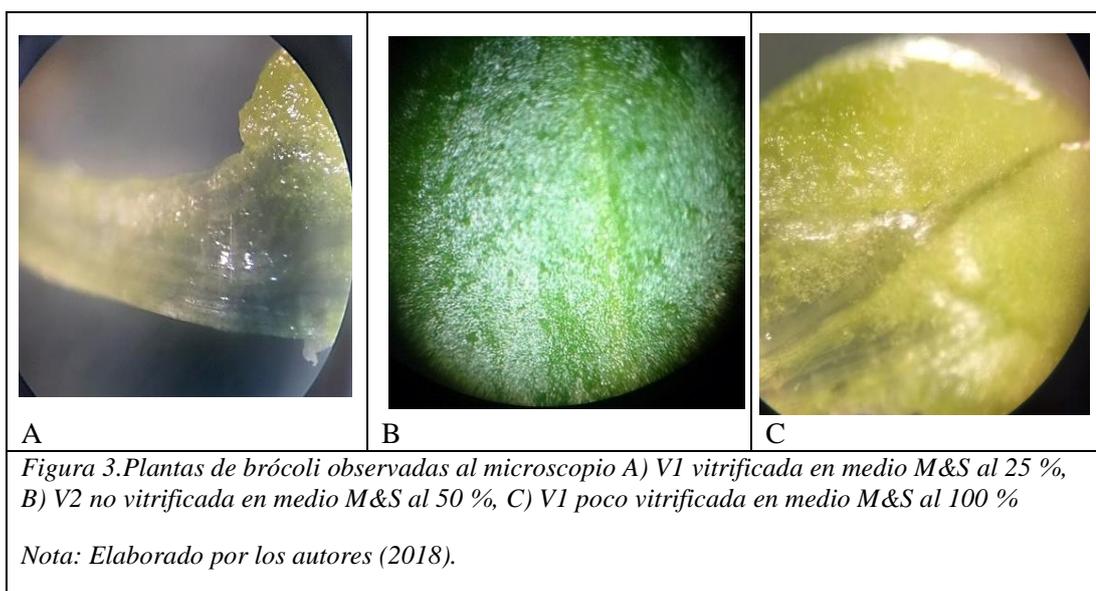
La variable color de hoja en el medio M2 (50 %) presentó la mejor coloración para las dos variedades, con un promedio de 4,38 que representa un color verde oliva (Figuras 1 y 2), mientras que las concentraciones de sales M1 (100 %) y M3 (25 %) fueron semejantes estadísticamente presentando una coloración verde y verde cartuja con un

promedio (3,13 y 2,88, respectivamente) (Tabla 7). La concentración de sales M2 (50 %) permite obtener explantes con mayor contenido de pigmentos verdes (clorofila). Según Vaca & Landázuri (2013, págs. 52-53), las plantas en medios M&S al 50 % tienen un mayor índice de contenido de clorofila (ICC) lo que implica que su coloración fue mayor, mientras que a concentraciones del 100 % y 25 % se obtuvo el menor índice de contenido de clorofila generando plantas con menor coloración. Presentándose una relación entre índice de clorofila y la coloración, a mayor índice de clorofila existirá una mayor coloración verde en las hojas mientras que a menor índice de clorofila las hojas presentaran una menor coloración (Casierra, Peña, & Ulrichs, 2011).



La variable consistencia del tallo (grado de vitrificación) no presentó diferencias significativas (Tabla 3) en todas las fuentes de variación, sin embargo se puede observar que al evaluar la concentración de sales (Tabla 4), el medio M2 (50 %) no mostró vitrificación seguido de M1 (100 %) con un promedio 5,38 de mientras, que M3 (25 %) presentó el mayor promedio para vitrificación (6,25) (Figura 3A), estos resultados guardan relación con Sharry, Adema, & Abedini (2015, pág. 104), quienes

afirman que la vitrificación es un problema *in vitro* que se presenta por una reducción o exceso en factores nutricionales generando un menor contenido clorofílico. Por lo tanto las concentraciones de sales altas 100 % y bajas 25 % favorecen a problemas como vitrificación y clorosis, presentándose por una alteración fisiológica en las plantas al no asimilar el exceso o la falta de nutrientes que presenta el medio M&S al 100 o 25 %, generando los cambios mencionados en explantes de brócoli (Figura 3).



Para la variable número de hojas las concentraciones de sales M1 (100 %) y M2 (50 %) presentaron el mayor número promedio de hojas (Tabla 4), esto coincide con Hisayuki, Delio, & Droste (2016, págs. 1071-1072), quienes probaron concentraciones de M&S al 100 %, 50 % y 25 % en de *Vriesea incurvata*, obtuvieron buenos resultados con una dilución de macronutrientes a una concentración de sales al 50 % produciendo mayor número de hojas, mientras que el medio al 100 % mostró un reducción en el número de hojas, debido a que algunas especies en exceso de nutrientes presentan una disminución de los parámetros morfológicos y por ende el desarrollo del explante se ve perjudicado.

En la variable diámetro óptimo del tallo los tres medios empleados fueron adecuados sin presentar diferencia alguna, por lo tanto los tratamientos fueron óptimos por presentar un diámetro mayor o igual a 2 mm.

3.1.2 Fase de multiplicación

Se efectuó un análisis de las variables: longitud del tallo, porcentaje de brotación y diámetro óptimo del tallo (Tabla 5) para evaluar los seis tratamientos. En esta fase los explantes fueron sembrados en diferentes concentraciones de medios M&S, adicionado con AIA (0,2 ppm), en dosis fija.

Tabla 5.

Análisis estadístico para las variables longitud del tallo, porcentaje de brotación y diámetro óptimo del tallo durante la fase durante la fase multiplicación *in vitro*

Tipo de Variable	Paramétrica	No paramétrico	
		Brotación (%)	Diámetro óptimo del tallo
F.V	Long. Tallo (cm)		
Tratamiento	0,0009 **	0,0150 *	0,0054 **
Variedad	0,2815 ^{ns}	0,7938 ^{ns}	0,9311 ^{ns}
Sales	0,0002 **	0,0010 **	0,0003 **
Sales* Variedad	0,2934 ^{ns}	0,5150 ^{ns}	0,0054 **

* Diferencia significativa ($p \leq 0,05$), ** Diferencia altamente significativa ($p \leq 0,01$), ns - No significativo. Nota: Elaborado por los autores (2018).

Para los tratamientos y la concentración de sales M&S, las variables longitud del tallo y diámetro óptimo del tallo presentaron alta diferencia significativa ($p \leq 0,01$) mientras que porcentaje de brotación ($p \leq 0,05$) presentó diferencia estadística para tratamientos y alta diferencia estadística en concentración de sales, además la variable diámetro óptimo del tallo, también presentó alta diferencia significativa para la interacción concentración de sales por variedad (Tabla 5). Mientras que para las tres variables evaluadas la variedad no presentó diferencias ($p > 0,05$).

Para la variable longitud del tallo las mejores concentraciones de sales fueron M1 (100 %) y M2 (50 %) por presentar los mayores valores promedio con 4,5 y 3,3 cm respectivamente. Mientras que el tratamiento M1V1 (Variedad 1 en medio M&S 100 %) resultó el mejor (Tabla 6), por presentar el valor promedio más alto (5,39 cm), seguido por los tratamientos M1V2, M2V1 y M2V2, que comparten el mismo rango de significancia; por lo tanto, se recomienda concentraciones alta o media de sales para obtener explantes con una longitud adecuada durante la fase de multiplicación *in vitro*, esto concuerda con Pérez & Castañeda (2017, págs. 102-103), quienes obtuvieron resultados similares en mora silvestre al evaluar el medio M&S reducido o no en un 50 % y suplementado con diferentes concentraciones de AIA y BAP, determinando que la concentración de sales al 50 % suplementado con AIA fue el tratamiento más adecuado para generar una mayor longitud del tallo, seguido de cerca por el medio al 100 % ya que fueron estadísticamente semejantes.

Tabla 6.

Promedios \pm error estándar para las variables longitud del tallo, porcentaje de brotación y diámetro óptimo del tallo al evaluar las concentraciones de sales y tratamientos en explantes de brócoli en fase de multiplicación *in vitro*

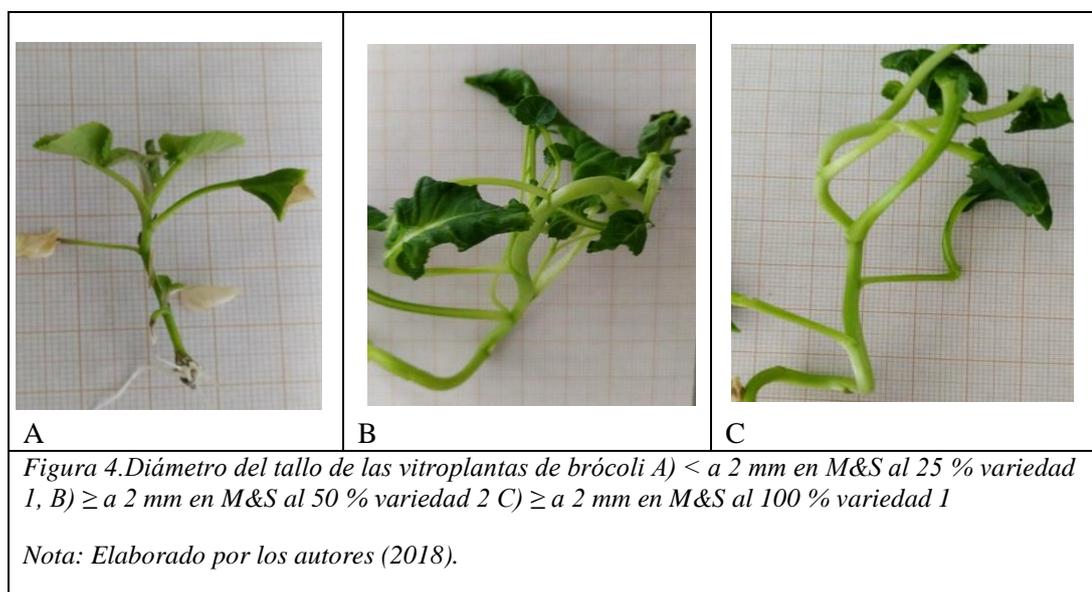
Sales	Long. Tallo (cm)	Brotación (%)	Diámetro óptimo Tallo
M1	4,54 \pm 0,46 a	100,00 \pm 4,69 a	8,33 \pm 0,56 a
M2	3,39 \pm 0,46 a	93,75 \pm 4,69 ab	7,83 \pm 0,56 ab
M3	1,66 \pm 0,46 b	77,08 \pm 4,69 b	5,00 \pm 0,56 b
Tratamiento	Long. Tallo (cm)	Brotación (%)	Diámetro óptimo Tallo
M1V1	5,39 \pm 0,65 a	100,00 \pm 6,67 a	8,33 \pm 0,46 a
M2V1	3,62 \pm 0,65 ab	95,83 \pm 6,67 a	7,75 \pm 0,46 ab
M3V1	1,48 \pm 0,65 b	75,00 \pm 6,67 b	5,08 \pm 0,46 c
M1V2	3,72 \pm 0,65 ab	100,00 \pm 6,67 a	8,33 \pm 0,46 a
M2V2	3,19 \pm 0,65 ab	91,67 \pm 6,67 a	7,92 \pm 0,46 a
M3V2	1,85 \pm 0,65 b	79,17 \pm 6,67 b	4,92 \pm 0,46 c

Nota: Promedios de letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($\leq 0,05$). Elaborado por los autores (2018).

Para la variable porcentaje de brotación la mejor concentración de sales fue M1 (100 %) llegando al 100 % de explantes brotados, seguido por M2 (50 %), esta última comparte características semejantes con la concentración M3 (77 % de brotación), por esta razón la concentración de sales M1 resultó óptima. Los mejores tratamientos fueron M1V1, M1V2, M2V1 y M2V2 ya que comparten el mismo rango de significancia (Tabla 6) con un promedio superior al 91 % de brotación; los datos obtenidos concuerdan con estudios realizados por Ríos, Enríquez, Rodríguez, & Ruíz (2017, págs. 288-289), quienes obtuvieron buenos resultados en *Agave angustifolia* al probar AIA y BAP en medio M&S al 100 % durante la fase multiplicación *in vitro*, demostraron que la presencia de AIA en el medio M&S promueve la formación y el buen desarrollo de brotes, permitiendo su correcta proliferación; además, encontraron una correlación positiva, a mayor concentración de AIA se genera mayor número de brotes, por lo tanto se recomiendan para ambas variedades las concentraciones de sales M1 y M2 empleadas para la multiplicación de brócoli con la adición de 0,2 ppm de AIA, como se evaluó en la presente investigación funcionan adecuadamente para ambas variedades.

Para la variable diámetro óptimo del tallo, el medio M1 (100 %) resultó el mejor con un valor promedio de 8,33 que significa que la mayoría de *vitroplantas* obtuvieron un diámetro igual o mayor a 2 mm, mientras que los tratamientos M1V1, M1V2 y M2V2 fueron los mejores seguidos de M2V1 (Tabla 6) de tal forma que para las dos variedades los tratamientos con mayor concentración de sales M1 y M2, fueron los mejores con un diámetro de tallo mayor a 2 mm (Figura 4), por lo que fueron elegidos para pasar a la siguiente fase. Según Enríquez, Rodríguez, & Campos (2016, pág. 269), las concentraciones de sales altas (M&S al 100 %) producen plantas con mayor

diámetro del tallo, mientras que las concentraciones de sales bajas (25 %) no abastecen al desarrollo del tallo generando plantas de menor grosor.



3.2 Evaluación de sustratos

3.2.1 Fase de aclimatación

Se analizó la longitud del tallo y el porcentaje de enraizamiento al finalizar la fase para evaluar los cuatro tratamientos (Tabla 7). Los sustratos evaluados fueron: S1 (50 % de turba y 50 % bentonita) y S2 (75 % de turba y 25 % de humus).

Tabla 7

Análisis estadístico para las variables longitud del tallo y porcentaje de enraizamiento, para la evaluación de los sustratos.

F.V	Long. Tallo (cm)	Enraizamiento (%)
Tratamiento	0,0002 **	0,0001 **
Sustrato	$< 0,0001$ **	$< 0,0001$ **
Variedad	0,7063 ^{ns}	$> 0,9999$ ^{ns}
Sustrato* Variedad	0,2660 ^{ns}	0,5239 ^{ns}

* Diferencia significativa ($p \leq 0,05$), ** Diferencia altamente significativa ($p \leq 0,01$), ns - No significativo. Nota: Elaborado por los autores (2018).

Las variables longitud del tallo y porcentaje de enraizamiento presentaron alta diferencia significativa ($p \leq 0,01$) tanto en los tratamientos como en los sustratos

utilizados, mientras que para la variedad y la interacción no existió diferencia estadística.

Tabla 8.

Promedios \pm error estándar para las variables longitud del tallo y porcentaje de enraizamiento, al evaluar los sustratos y tratamientos en plántulas de brócoli durante la fase de aclimatación.

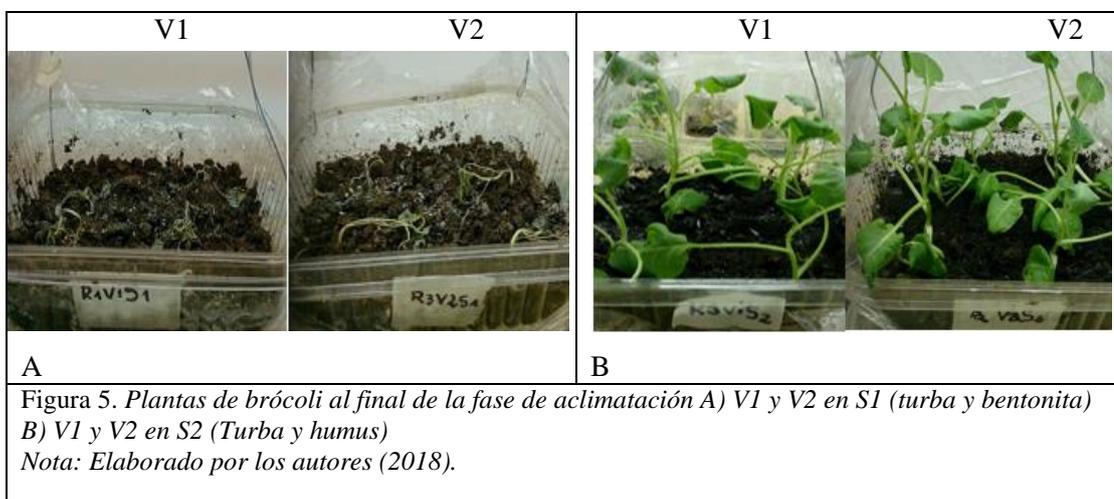
Sustrato	Long. Tallo (cm)	Enraizamiento (%)
S1	2,50 \pm 0,49 b	13,89 \pm 5,89 b
S2	8,36 \pm 0,49 a	91,67 \pm 5,89 a
Tratamiento	Long. Tallo (cm)	Enraizamiento (%)
S1V1	1,95 \pm 0,69 b	11,11 \pm 8,33 b
S2V1	8,08 \pm 0,69 a	94,44 \pm 8,33 a
S1V2	3,04 \pm 0,69 b	16,67 \pm 8,33 b
S2V2	8,64 \pm 0,69 a	88,89 \pm 8,33 a

Nota: Promedios de letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($\leq 0,05$). Elaborado por los autores (2018).

Para la variable longitud del tallo el mejor sustrato fue S2 (75 % turba y 25 % humus), con un promedio de 8,36 cm. Los mejores tratamientos fueron S2V1 y S2V2 con los más altos valores con unos promedios de longitud del tallo de 8,08 y 8,64 cm respectivamente (Tabla 8), de tal forma que al combinar el humus con la turba se obtuvieron resultados favorables, mismos que concuerdan con concuerdan con Jiménez, y otros (2012, págs. 42-43), quienes recomiendan para la fase de aclimatación de *vitroplantas* de malanga, plátano y guayaba usar humus como sustrato, debido a que presenta características químicas que permite que las plantas obtengan los nutrientes y materia orgánica necesarios durante la etapa inicial de desarrollo y crecimiento. Además, estudios realizados por Benavides & Córdoba (2015), obtuvieron buenos resultados en el crecimiento de plantas de *Geranium chilloense* Willd. Ex Kunth. y *Lupinus pubescens* Beth presentando los mayores valores en longitud, ya que según Moreno, Álvarez, Balaguera, & Fischer (2009, págs. 6-7), la

turba al permitir mayor acumulación de fotoasimilados, provee un efecto estimulador para el desarrollo y crecimiento de las plantas.

Para la variable porcentaje de enraizamiento el sustrato compuesto por turba y humus (S2), resultó ser el mejor para lograr el enraizamiento en *vitroplantas* de brócoli, con un 91,7 % de formación de raíces (Figura 5). Los tratamientos S2V1 y S2V2 fueron adecuados al presentar los valores promedio más altos (94,4 y 88,9 %, respectivamente), por lo tanto se sugiere emplear la combinación de los sustratos turba y humus en una relación 3:1 para alcanzar un enraizamiento cercano al 90 %. Debido a que el humus durante la aclimatación de plantas permite retener gran cantidad de agua, favorece un adecuado intercambio catiónico, el aporte de nutrientes y mayor permeabilidad (Barbon, y otros, 2014, págs. 211-213), características que favorecieron al enraizamiento de las plantas de brócoli en la presente investigación. Además al combinar humus con turba los resultados fueron favorables ya que, según Moreno, Álvarez, Balaguera & Fischer (2009, págs. 6-7), la turba es un sustrato adecuado para el crecimiento de raíces porque provee una apropiada humedad, contenido de nutrientes y una correcta aireación por la porosidad que ofrece permitiendo el desarrollo de las raíces.



3.3 Evaluación de la eficiencia fotosintética

3.3.1 Fase de multiplicación

Se realizó una evaluación sobre eficiencia fotosintética de los explantes que provenían de la fase II, los tratamientos (Tabla 1) fueron valorados al ingreso, en subcultivo y al final de la fase de multiplicación (Tabla 9).

Tabla 9.

Análisis estadístico para la variable de eficiencia fotosintética, evaluada al ingreso de la fase, durante el ingreso de subcultivo y al final de la fase de multiplicación.

F.V	Eficiencia Ingreso	Eficiencia Subcultivo	Eficiencia Final
Tratamiento	0,2192 ^{ns}	< 0,0001**	< 0,0001**
Variedad	0,6233 ^{ns}	0,0002**	0,4645 ^{ns}
Sales	0,2356 ^{ns}	0,0004**	< 0,0001**
Sales* Variedad	0,1410 ^{ns}	0,0615 ^{ns}	0,3505 ^{ns}

* Diferencia significativa ($p \leq 0,05$), ** Diferencia altamente significativa ($p \leq 0,01$), ns - No significativo. Nota: Elaborado por los autores (2018).

Para la variable eficiencia fotosintética en subcultivo existió alta diferencia significativa ($p \leq 0,01$) en concentración de sales, variedad y tratamientos, mientras que al finalizar la fase existió alta diferencia significativa ($p \leq 0,01$) en la concentración de sales y tratamientos (Tabla 9).

Para la variable eficiencia fotosintética al ingreso de la fase de multiplicación las plántulas no presentaron diferencias, lo que significa que todas las plántulas ingresaron en las mismas condiciones fisiológicas.

En subcultivo, las mejores concentraciones de sales fueron M1 (100 %) y M2 (50 %) ya que presentaron un alto valor promedio (0,73 y 0,69, respectivamente), de igual manera al finalizar la fase los medios M1 y M2 resultaron los mejores con los valores más altos con un promedio de 0,72 y 0,64 correspondientemente. Sin embargo M1 se

considera el medio óptimo debido a que presenta los niveles de estrés más bajos. Según Melo, Souza, & Cunha (2017, págs. 235-236), los valores de Fv/Fm entre 0,75 a 0,86 representan un estado sin estrés, por lo tanto, el sistema fotosintético PSII de la planta se encuentra en perfectas condiciones con niveles altos en la eficiencia de conversión fotosintética de PSII, mientras que valores de Fv/Fm inferiores a 0,69 presentan niveles de estrés altos, pues a medida que disminuye la eficiencia fotosintética se generan daños en el centro de reacción del PSII. Los resultados difieren con los descritos por Vaca & Landázuri (2013, pág. 53), quienes obtuvieron buenos resultados en *vitroplantas* de mora para la actividad del PSII con una concentración de sales al 50 %, para las *vitroplantas* de brócoli se recomienda una mayor concentración de sales (M&S al 100 %) para mantener el buen funcionamiento del PSII, esto se debe a los requerimientos propios de cada especie.

Tabla 10.

Promedios \pm error estándar para la variable eficiencia fotosintética al evaluar las concentraciones de sales, variedad y tratamientos en explantes de brócoli durante la fase de multiplicación *in vitro*.

Sales	Eficiencia Ingreso	Eficiencia Subcultivo	Eficiencia Final
M1	0,75 \pm 0,004 a	0,73 \pm 0,02 a	0,72 \pm 0,03 a
M2	0,74 \pm 0,004 a	0,69 \pm 0,02 a	0,64 \pm 0,03 a
M3	0,74 \pm 0,004 a	0,60 \pm 0,02 b	0,41 \pm 0,03 b
Variedad	Eficiencia Ingreso	Eficiencia Subcultivo	Eficiencia Final
V1	0,75 \pm 0,004 a	0,72 \pm 0,02 a	0,69 \pm 0,02 a
V2	0,74 \pm 0,004 a	0,62 \pm 0,02 b	0,58 \pm 0,02 a
Tratamiento	Eficiencia Ingreso	Eficiencia Subcultivo	Eficiencia Final
M1V1	0,74 \pm 0,01 a	0,75 \pm 0,03 a	0,73 \pm 0,03 a
M2V1	0,75 \pm 0,01 a	0,72 \pm 0,03 a	0,63 \pm 0,03 ab
M3V1	0,74 \pm 0,01 a	0,71 \pm 0,03 a	0,46 \pm 0,03 bc
M1V2	0,76 \pm 0,01 a	0,69 \pm 0,03 a	0,72 \pm 0,03 a
M2V2	0,74 \pm 0,01 a	0,64 \pm 0,03 ab	0,66 \pm 0,03 ab
M3V2	0,74 \pm 0,01 a	0,52 \pm 0,03 b	0,35 \pm 0,03 c

Nota: Promedios de letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa la prueba de Tukey ($\leq 0,05$). Elaborado por los autores (2018).

También se encontró diferencia estadística entre las variedades durante el subcultivo, resultando V1 (Top Head F1) la mejor variedad con un valor promedio de 0,72 (Tabla 10), los resultados obtenidos son semejantes a los obtenidos por Lino, Lima, Rabelo & Rolim (2017, págs. 1-2), quienes evaluaron la eficiencia fotoquímica en diferentes variedades de *Copaifera* sp., presentando diferentes valores de Fv/Fm, debido a que cada especie presenta diferencias tanto morfológicas como anatómicas intraespecíficas que generan respuestas diferentes en cuanto a su funcionamiento.

Los tratamientos en subcultivo que presentaron los valores promedio más altos (fuera del rango de estrés alto) fueron M1V1, M2V1, M3V1 y M1V2 (0,75; 0,72; 0,71 y 0,69, respectivamente) ya que comparten el mismo rango de significancia, seguidos por el tratamiento M2V2 (0,64); M3V2 fue el tratamiento que presentó el menor valor promedio (0,52). Mientras que en la fase final los mejores tratamientos fueron M1V1 y M1V2 por presentar el valor promedio más alto (0,73 y 0,72, respectivamente, ambos fuera del rango de estrés alto) seguido de M2V2 y M2V1 con un valor promedio de 0,66 y 0,63 respectivamente (Tabla 10). Los tratamientos cultivados M3 (25 %) resultaron desfavorables con un rango promedio de 0,46 a 0,35; Silveira, Santos, Ferreira, Santos, & Silva (2017, págs. 5-6), reportan una concentración de sales al 25 % genera altos niveles de estrés con un valor de eficiencia bajo en explantes de *Brachiaria decumbens*, debido a como concentración de sales, reduciendo la captura de energía en los centros de reacción del PSII, lo que produce el deterioro de la planta e inclusive su muerte.

3.3.2 Fase de aclimatación

Se realizó un seguimiento semanal de los valores de eficiencia fotosintética en un periodo de 28 días (Tabla 11), en el cual las dos variedades de brócoli se adaptaron a

dos sustratos diferentes, los sustratos evaluados fueron: S1 (50 % de turba y 50 % bentonita) y S2 (75 % de turba y 25 % de humus).

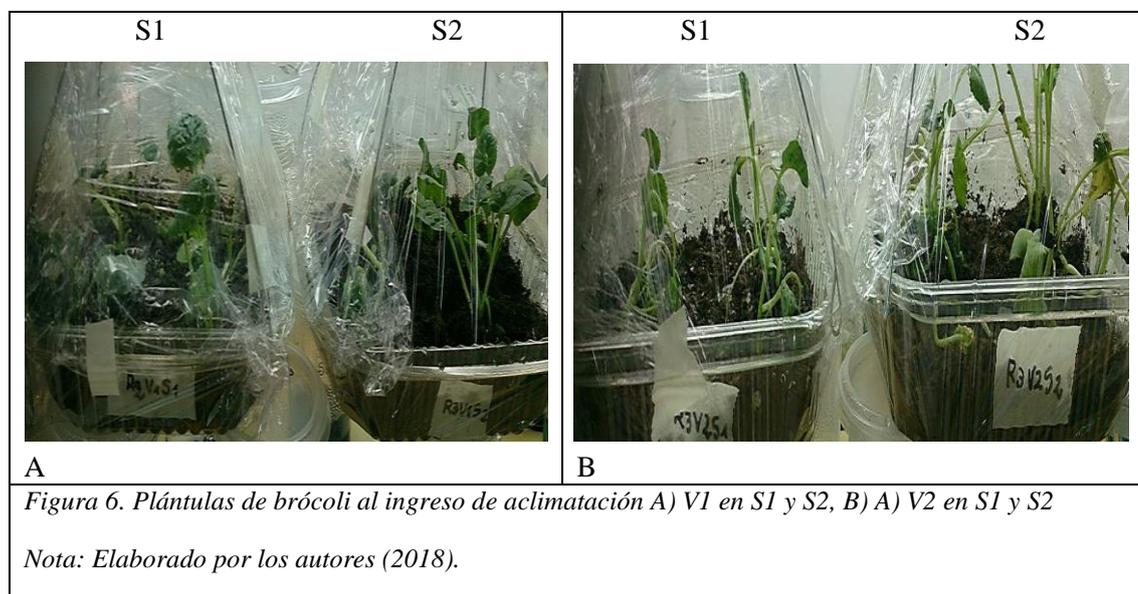
Tabla 11.

Análisis estadístico para la variable de eficiencia fotosintética para la evaluación semanal de los sustratos durante la fase de aclimatación.

F.V	Eficiencia Ingreso	Eficiencia Semana 1	Eficiencia Semana 2	Eficiencia Semana 3	Eficiencia Semana 4
Tratamiento	0,6158 ^{ns}	0,0003 ^{**}	< 0,0001 ^{**}	< 0,0001 ^{**}	< 0,0001 ^{**}
Sustrato	0,464 ^{ns}	< 0,0001 ^{**}	< 0,0001 ^{**}	< 0,0001 ^{**}	< 0,0001 ^{**}
Variedad	0,8042 ^{ns}	0,8345 ^{ns}	0,6414 ^{ns}	0,0981 ^{ns}	0,1775 ^{ns}
Sustrato* Variedad	0,2990 ^{ns}	0,7154 ^{ns}	0,5270 ^{ns}	0,8823 ^{ns}	0,9873 ^{ns}

* Diferencia significativa ($p \leq 0,05$), ** Diferencia altamente significativa ($p \leq 0,01$), ns - No significativo. Nota: Elaborado por los autores (2018).

La variable eficiencia fotosintética presentó alta diferencia estadística ($p \leq 0,01$) desde la semana uno hasta finalizar la fase de aclimatación (semana cuatro) tanto en tratamientos como en sustratos (Tabla 11), mientras que en el ingreso a la fase no presentó diferencia significativa en todas las fuentes de variación (Figura 6).



Al evaluar la eficiencia fotosintética en aclimatación, las plántulas durante el ingreso no presentaron diferencias, lo que significa que todas las plantas ingresaron en un mismo estado fisiológico.

Tabla 12.

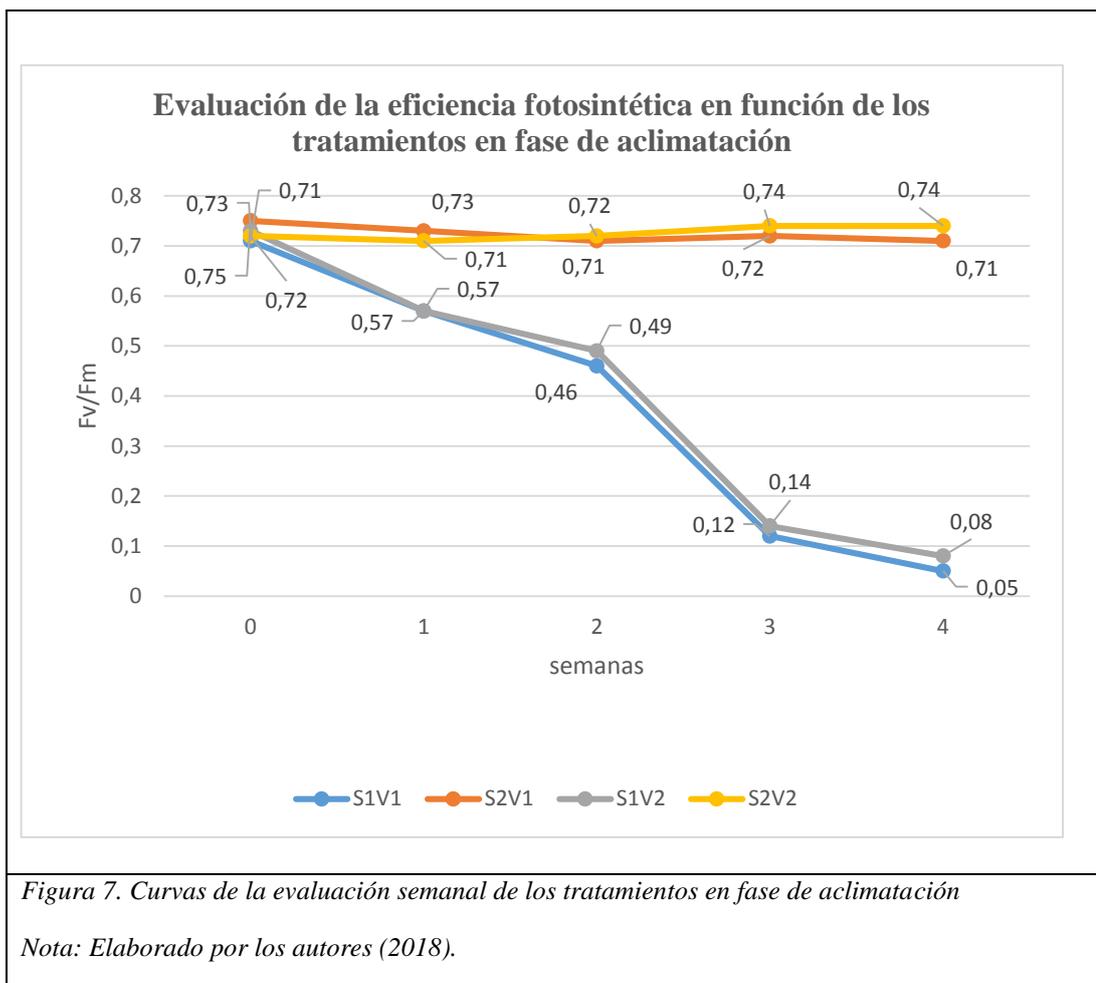
Promedios \pm error estándar para la variable eficiencia fotosintética al evaluar los sustratos en plántulas de brócoli durante la fase de aclimatación.

Sustrato	Eficiencia Ingreso	Eficiencia Semana 1	Eficiencia Semana 2	Eficiencia Semana 3	Eficiencia Semana 4
S1	0,72 \pm 0,01 a	0,51 \pm 0,01 b			
S2	0,73 \pm 0,01 a	0,72 \pm 0,01 a	0,72 \pm 0,01 a	0,72 \pm 0,01 a	0,72 \pm 0,01 a

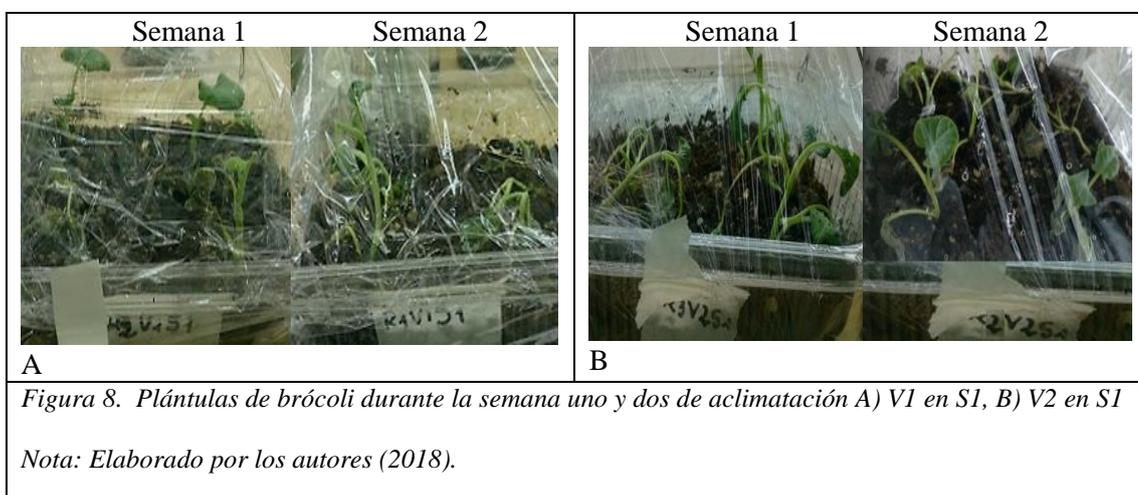
Nota: Promedios de letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($\leq 0,05$). Elaborado por los autores (2018).

El sustrato S2 (75 % turba y 25 % humus) resultó el mejor con el valor de eficiencia más alto durante los 28 días de evaluación, manteniéndose en un valor promedio de 0,72 desde la primera semana hasta finalizar la fase de aclimatación (Tabla 12) lo que implica niveles de estrés bajos, debido a que se encuentra dentro del rango entre 0,69 a 0,75 (Melo, Souza, & Cunha, 2017).

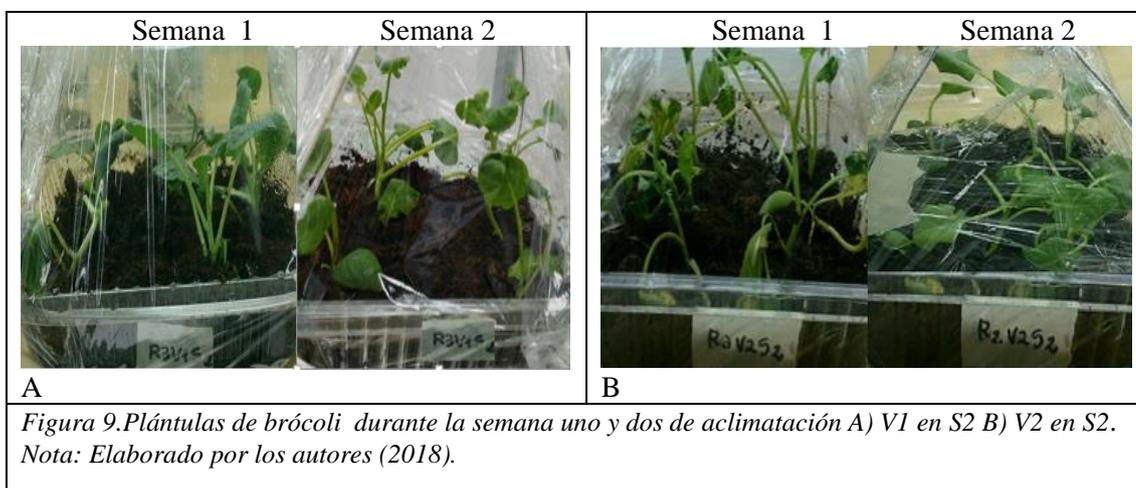
Los tratamientos al inicio de la fase se encontraban en un rango entre 0,71 a 0,75 sin presentar diferencia alguna, en el transcurso semanal se puede observar que los tratamientos S2V1 y S2V2 presentaron los valores de eficiencia más altos demostrando que las plántulas de brócoli en el sustrato S2 (Turba y Humus) presentaron bajos niveles de estrés pues los valores de eficiencias fotosintéticas obtenidas no fueron inferiores a 0,69 llegando a obtener un valor promedio de 0,74 y 0,71 tanto en S2V1 como S2V2 respectivamente (Figura 6).



Por otro lado, los tratamientos S1V1 y S1V2 se puede observar una disminución progresiva de la eficiencia fotosintética a partir de la semana uno hasta finalizar la fase de aclimatación, presentando los menores valores promedio (0,08 y 0,05, respectivamente) con una elevada cantidad de plántulas muertas (85 %) (Figura 8).



De los valores obtenidos, se determinó que las dos variedades respondieron correctamente a S2 que contenía turba y humus, al presentar una eficiencia fotosintética alta (0,72) en condiciones *ex vitro* (Figura 9), esto puede atribuirse a lo señalado por Angulo, y otros (2017, págs. 7-8), quienes afirman que al medir la eficiencia fotoquímica en variedades de *Capsicum annuum* L. se puede determinar los daños asociados al PSII al comparar plantas fertilizadas versus no fertilizadas, obteniendo como resultado un gran potencial fotosintético en las plantas fertilizadas, por la alta disponibilidad de nutrientes lo que genera bajos niveles de estrés. Las plantas de brócoli aclimatadas en turba y humus, presentaron altos valores de eficiencia fotosintética lo que refleja un estado fisiológico y de sanidad bueno, resultados que fueron posibles gracias a los nutrientes que aporta el humus al ser un fertilizante orgánico, con abundante actividad biológica (Flora bacteriana) (Soto, Piña, Sánchez, Pérez, & Basurto, 2016, pág. 141).



Conclusiones

Las tres concentraciones de sales M&S en establecimiento *in vitro* fueron adecuadas para la germinación de *vitroplantas* de brócoli, sin embargo la coloración óptima se obtuvo con la concentración M2 (50 %), color verde oliva (4,38), además las plántulas no presentaron vitrificación (5) de acuerdo a la escalas cualitativas empleadas.

La concentración de sales M&S en multiplicación *in vitro* que permitió obtener el mayor porcentaje de brotación fue M1 (100 %) con un 100 % de brotación, mientras que para la longitud del brote las concentraciones M1(100 %) y M2 (50 %) resultaron adecuadas, con un promedio de 4,54 y 3,39 cm, respectivamente.

En aclimatación, el sustrato que permitió obtener un mayor porcentaje de enraizamiento fue S2 (75 % turba con 25 % humus) con un 91,67 % de plantas enraizadas y la mayor longitud del tallo con un promedio de 8,36 cm.

La mejor eficiencia fotosintética al inicio de subcultivo para multiplicación *in vitro*, se obtuvo con las concentraciones de sales M1 (100 %) y M2 (50 %) con un valor promedio de 0,73 y 0,69 respectivamente, resultando V1 (Top- Head F-1); la mejor variedad con un valor promedio de 0,72, mientras que al finalizar la fase la mejor eficiencia fotosintética se obtuvo con la concentración de sales M1 (100 %) con un valor promedio de 0,72 presentando bajos niveles de estrés para las dos variedades.

La mayor eficiencia fotosintética en aclimatación se logró en el sustrato 2 (75 % turba con 25 % humus) con un valor promedio al final de la fase de 0,73 demostrando que las plantas de brócoli presentan bajos niveles de estrés y buen estado de sanidad.

Recomendaciones

Durante la introducción *in vitro* de brócoli, se recomienda disminuir la concentración de sales a la mitad en el medio de 50 %, para evitar problemas en la coloración de las hojas.

Utilizar una concentración de sales al 100 % o 50 % para obtener altos porcentajes de brotación durante la fase multiplicación y plantas con una adecuada eficacia fotosintética sin alteraciones fisiológicas.

Emplear turba y humus como sustratos, en la fase de aclimatación de brócoli para obtener altos porcentajes de plantas enraizadas con alta tasa de eficiencia fotosintética y bajos niveles de estrés.

Analizar la eficiencia fotosintética durante el cultivo *in vitro* de otras especies de interés agronómico con el fin de determinar las condiciones adecuadas para la propagación de diferentes especies vegetales.

Bibliografía

- Aguilar Yáñez, E. (2014). Los micronutrientes en las plantas. En *Determinación del estado sanitario de las plantas, suelo e instalaciones y elección de métodos de control* (Primera ed., págs. 30-32). Málaga, España: ic editorial.
- Angulo, A., Ferrera, R., Alarcón, A., Almaraz, J., Delgadillo, J., Jiménez, M., & García, O. (2017). Crecimiento y eficiencia fotoquímica del fotosistema II en plántulas de 2 variedades de *Capsicum annuum* L. inoculadas con rizobacterias u hongos micorrícicos arbusculares. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(2), 7-8.
- Aros, D., Vásquez, M., Rivas, C., & Loreto, M. (2017). An efficient method for *in vitro* propagation of *Alstroemeria pallida* Graham rhizomes. *Revista chilena de investigación agrícola*, 77(1), 95-96.
- Barbon, R., Nguyen Thi, H., Capote, A., Feria, M., Pérez, A., Rivero, L., . . . Hurtado, O. (2014). Efecto de mezclas de sustratos en la fase de conversión de plantas de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' obtenidas por embriogénesis somática. *Bioteología Vegetal*, 14(4), 211-213.
- Basantes, T., & Vilema, B. (2017). Evaluación de zeolita y carbón activado en el cultivo de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Avenger*) en la granja la pradera, cantón Antonio Ante, provincia de Imbabura. *Trabajo de grado en Ingeniería Agropecuaria. Universidad Técnica del Norte*. Ibarra, Ecuador.
- Benavides, T., & Córdoba, A. (2015). Desarrollo de un protocolo de propagación *in vitro* de *Geranium chilloense* Willd. Ex Kunth. y *Lupinus pubescens* Beth. Para la obtención de plantas completas, para la primera etapa de restauración de las quebradas de Quito. (Tesis de Grado). Universidad Politécnica Salesiana. Quito.
- Bimport. (2017). *brimportseed.com*. Obtenido de Características de Brócoli Waltham 29:
http://brimportseed.com/variedadsemillas.htm?Br%F3coli_Waltham_29&VARC=7
- Bisbicuz, J., & Velez, C. (03 de 2015). Plan Logístico para la exportación de Brócoli desde el Puerto de Tumaco hacia EEUU. *Facultad de Ciencias Económicas y Administrativas*, 24-27. San Juan de Pasto, Colombia: Universidad de Nariño.
- Calderón, A., Restrepo, A., & Urrea, A. (2011). Morfogénesis *in vitro* a partir de yemas apicales y bases de hojas de las especies de bromelias *Aechmea veitchii* y *Racinaea crispa*. *Actual Biology*, 33(94), 17-33.
- Calvache, Á., & Sánchez, B. L. (21 de 10 de 2013). Respuesta del brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) híbrido fantástico a la fertilización con cinco fuentes de azufre aplicadas a dos dosis. mulaló, Cotopaxi. *Tesis de Grado. Universidad Central del Ecuador*, 5. Latacunga, Cotopaxi, Ecuador.

- Calvopiña, D. (04 de 2015). Análisis de competitividad del sector del Brócoli en Ecuador en el período 2007-2013. *Tesis de Grado. Facultad de Economía. Pontificia Universidad Católica del Ecuador*, 27-28. Quito, Ecuador.
- Camargo, S., Silva, D., Moreira, C., Marinho, A., Tadeu, R., & Wullf, M. (2015). Fitorreguladores e espectros de luz na micropropagação de *Oncidium baueri* Lindl. *Ciencia Rural*, 45(11), 2007-2012.
- Capinera, J. L. (2001). En *Handbook of Vegetable Pests* (Primera ed., págs. 605-611). Orlando, Estados Unidos: Academic Press.
- Cárdenas, C., Pacheco, J., & Vanzela, A. (2016). Propagación *in vitro* de *Solanum dolichosepalum* (Solanaceae). *Ciencia en desarrollo*, 7(2), 9-22.
- Casierra, F., Peña, J., & Ulrichs, C. (2011). Crecimiento y eficiencia fotoquímica del fotosistema II en plantas de fresa (*Fragaria* sp.) afectadas por la calidad de la luz: implicaciones agronómicas. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), 43-45.
- Castilla, Y. (2005). Cultivo de Tejidos de Rosas (*Rosa* sp): un acercamiento a investigaciones recientes. *Revista Cultivos Tropicales*, 26(4), 43-47.
- Dănăilă, S., Rosu, A., Ionica, M., Visan, L., & Dobrinou, R. (2012). Caulogenesis Approaches Applied *in vitro* Micropropagation of varieties Cabeza Negra 2, Arena And Red Amager of *Brassica oleracea* var. *capitata* rubra form. *Ingenta Connect*, 1(1), 75-76. Recuperado el Septiembre de 2017
- De Jesús, E., & Cano, J. (2012). Semillas sintéticas. El campo del futuro. *Revista ciencia y desarrollo*, 18-19.
- Díaz, E., Henao, A., & Ramírez, L. (2013). Residuos agrícolas de la cebolla larga como fuente de ácido gibéberico. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 16(2), 369-360.
- Diro, M., van Staden, J., & Bornman, C. (10 de 2004). Propagation of Ensete *in vitro*: a review. *South African Journal of Botany*, 70(4), 497-501.
- Enríquez, J., Rodríguez, G., & Campos, G. (2016). Effect of culture medium and incubation on the characteristics of micropropagated agave plants. *Ciencia e Investigación Agraria*, 43(2), 269.
- Fernández, C., Díaz, M., & González, L. (2016). Rooting *in vitro* of zygotic embryos of *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart. *Colombia Forestal*, 19(1), 67-70.
- Ferraro, G., Martino, V., & Bandoni, A. (2012). Fitocosmética: fitoingredientes y otros productos naturales. En *Polifenoles en cosmética* (Primera ed., págs. 79-80). Buenos Aires, Argentina: Eudeba.
- Fierro, D., & De la Torre, R. (05 de 2013). Estudio de factibilidad para la producción y comercialización de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) híbrido Avenger para mercado de exportación en Cunchibamba, provincia de Tungurahua. *Tesis de Grado. Universidad San Francisco de Quito*. Quito, Ecuador.

- Flores, M., Martínez, T., Rodríguez, J., Nieto, D., Colinas, M., & Martínez, J. (2015). Efecto del jugo de brócoli y cambios químicos en la inhibición de *Alternaria* en arúgula mínimamente procesada. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(6), 1163-1165.
- García, D., Meza, N., & Ocampo, M. (2015). Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 76-84.
- García, R., Quiroz, K., & Carrasco, B. (2010). Cultivo de tejidos vegetales: estado actual, oportunidades y desafíos. *Ciencia e investigación agraria*, 37(3), 5-6.
- Garrido, L. (2016). Parámetros de eficiencia fotosintética al final de la maduración como indicadores del potencial enológico del viñedo. *Tesis de Grado. Universidad de Valladolid*. Valladolid, España. Recuperado el Septiembre de 2017
- Gayosso, S., Borges, L., Villanueva, E., Estrada, M., & Garruña, R. (2016). Sustratos para producción de flores. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*, 50(5), 618-619.
- Gobbi, R., Silva, V., Pombo, C., & Rodrigues, R. (2017). Developing an *in vitro* optimized protocol to sweet potato landraces. *Acta Scientiarum.*, 39(3), 359-360.
- González, S., Perales, H., & Salcedo, M. (2008). La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(4), 119-120.
- Hisayuki, M., Delio, E., & Droste, A. (2016). Baixas concentrações de macronutrientes beneficiam a propagação *in vitro* de *Vriesea incurvata* (Bromeliaceae), uma espécie endêmica da Floresta Atlântica, Brasil. *Rodriguésia*, 67(4), 1071-1072.
- Hwan Kim, D., & Sivanessian, I. (2016). Influence of Benzyladenine and Thidiazuron on Shoot Regeneration from Leaf and Shoot tip Explants of *Sedum sarmentosum* Bunge. *Archivos brasileños de biología y tecnología*, 59, 2-3.
- IAEA. (02 de 2004). Obtenido de IAEA-TECDOC-1384: https://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/te_1384_web.pdf
- Igarza, J., Agramonte, D., Alvarado, Y., & De Fera, M. (2012). Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla. *Revista de Biotecnología Vegetal*, 12(1), 3-24.
- Jiménez, F., Agramonte, D., Ramírez, M., Pérez, M., La O Cárdenas, M., Pons, M., & Collado, R. (2012). Uso de humus de lombriz en la formulación de sustratos para la aclimatización de cultivos tropicales. *Centro Agrícola*, 39(3), 42-43.
- Jiménez, S., Alvarado, O., & Balaguera, H. (2015). Fluorescencia como indicador de estrés. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(1), 150-151.

- Kadhimi, A. A., Alhasnawi, A. N., Mohamad, A., Yusoff, W., & Zain, C. (2014). Tissue culture and some of the factors affecting them and the micropropagation of strawberry. *Life Science Journal*, 11(8), 484-493.
- Kittiwongwattana, C., & Vuttipongchaiki, S. (30 de 01 de 2013). Effects of nutrient media on vegetative growth of *Lemna minor* and *Landoltia punctata* during *in vitro* and *ex vitro* cultivation. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 7(1), 60-69.
- Lanfranco, J., Pellegrini, A., & Cattani, V. (2014). Sales Minerales. En *Contenidos de edafología, génesis, evolución y propiedades físico químicas del suelo* (Primera ed., pág. 103). Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de La Plata.
- Lino, A., Lima, L., Rabelo, T., & Rolim, L. (2017). Water deficit ensures the photochemical efficiency of *Copaifera*. *Revista Árbore*, 41(2), 2.
- Liñán Carral, C. (2015). Aminoácidos con elementos secundarios. En *Productos e insumos para agricultura orgánica* (Primera ed., pág. 173). Madrid, España: EcoVad.
- Lizmayer Massri, M. (2004). Respuesta de tres cultivares de brócoli (*Brassica oleracea* var *italica*) a diferentes fechas. *Tesis doctoral en Agronomía. Universidad Austral de Chile*. Valdivia, Chile.
- Loyola, V., & Vázquez, F. (2006). En *Plant Cell Culture Protocols* (Segunda ed., págs. 15-16). New Jersey: Humana Press.
- Mahn, A., Román, J., & Reyes, A. (2016). Efecto de la Liofilización de Brócoli Pre-Procesado sobre la Cinética de Secado y el Contenido de Sulforafano. *Información Tecnológica*, 27(6), 96-97.
- Martínez, Y., Andrade, M., Colinas, T., Villegas, Ó., Castillo, A., & Alia, I. (2015). Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pascuita (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). *Revista fitotecnia mexicana*, 38(4), 369-371.
- Melo, H., Souza, E., & Cunha, J. (2017). Fluorescence of chlorophyll a and photosynthetic pigments in *Atriplex nummularia* under abiotic stresses. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 21, 232-233.
- Montes, S., Lalama, J., Echeverría, J., & Salazar, S. (31 de 05 de 2016). Factores bióticos y abióticos que influyen en la aclimatación de las *vitroplantas*. *Revista científica Dominio de las Ciencias*, 2(2), 63-89.
- Moreno, N., Álvarez, J., Balaguera, H., & Fischer, G. (2009). Propagación asexual de uchuva (*Physalis peruviana* L.) en diferentes sustratos y a distintos niveles de auxina. *Agronomía Colombiana*, 27, 6-7.
- Msogoya, T., Maerere, A., Nzogela, Y., & Kusolwa, M. (2008). Changes in acidity of plant growth media during heat sterilisation. *Journal of Applied Biosciences*, 10, 488 - 490.

- Murchie, E., & Lawson, T. (03 de 08 de 2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, 64(13), 3983–3998.
- Narváez, R. A. (04 de 2010). Plan de Negocios para la exportación de brócoli hacia Estados Unidos, de la Empresa de Huertos Gatazo Zambrano , provincia de Chimborazo. *Tesis de Grado. Universidad Particular de Loja*, 17. Riobamba, Ecuador.
- Navroski, M., Reiniger, L., & Pereira, M. (2015). Alongamento *in vitro* de rebentos de *Eucalyptus dunnii* em função de diferentes genótipos e concentrações de ácido 1-naftil-acético (ANA). *Revista de Ciências Agrárias*, 38(1), 79-81.
- Ngomuo, M., Mneney, E., & Ndakidemi, P. (05 de 05 de 2014). The *in vitro* Propagation Techniques for Producing Banana Using Shoot Tip Cultures. *American Journal of Plant Sciences*, 5(11), 1614-1622.
- Oliveira, J., Costa, F., & Scherwinski, J. (2008). Micropropagación y estimativa de producción de mudas de bananos para la Amazonia Occidental. *Revista Pesquería Agropecuaria de Brazil*, 43(10), 1429-1432.
- Olmos, S., Luciani, G., & Galdeano, E. (2012). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. En *Micropropagación* (Primera ed., págs. 353-355). México: INTA.
- PanDia Seeds. (2017). *Pandiaseeds.org*. Obtenido de Types Broccoli : https://pandiaseeds.com/products/product/Top_Head_F-1/?categories=8
- Pérez Martínez, B. (16 de 10 de 2015). Establecimiento *in vitro* de *Hypericum goyanesii* Cuatrec. *Hypericum juniperinum* Kunth, a partir del cultivo de semillas. *Revista Colombiana de Biotecnología Bionota*, 17(2), 156-160.
- Pérez, B., & Castañeda, S. (2017). *In vitro* propagation of *Rubus macrocarpus* Benth. and *Rubus bogotensis* Kunth, as an ex situ conservation strategy. *Acta Agronómica*, 66(1), 102-103.
- Porta, J., López, M., & Potch, R. (2014). Elementos nutrientes. En *Edafología: uso y protección de suelos* (Tercera ed., págs. 244-245). Madrid, España: Mundi Prensa.
- Probiotek. (2017). *Murashige & Skoog (MS) Medium*. Recuperado el Enero de 2018, de Productos y Equipos Biotecnológicos: <http://www.probiotek.com/productos/reactivos/murashige-and-skoog-ms-medium/>
- Pucho, A., & Alecu, I. (2018). Aplicaciones Medicinales. En *Poder Farmacéutico De Los Alimentos: Alimentación Y Nutrición Aplicada Al Cuidado De La Salud, a La Prevención Y Tratamientos De Las Enfermedades* (Primera ed., pág. 467). España: Palibrio.
- Quintero, N., & Correa, C. (2010). Comparación de técnicas experimentales para la medición. *Revista Memorias*, 9(15), 84-90.

- Rangel, E., Hernández, E., & Hernández, M. (2016). Micropropagación de variedades de caña de azúcar cultivadas en México. *Revista fitotecnia mexicana*, 39(3), 225 - 226.
- Ravanfar, S., Aziz, M., & Shabanimofrad, M. (2013). Greenhouse evaluation on the performance of heat tolerant transgenic broccoli and genetic diversity analysis using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Revista Electrónica de Biotecnología*, 16(5), 1-2.
- Reyes, J., Carlos, L., Barrero, F., Ambrosio, J., Abud, M., Reiner, R., . . . Federico, G. (2016). Plant growth regulators optimization for maximize shoots number in *Agave americana* L. by indirect organogenesis. *Gayana. Botánica*, 73(1), 125-127.
- Ríos, S., Enríquez, J., Rodríguez, G., & Ruíz, J. (2017). Benzylaminopurine and indol-3-acetic acid concentrations *in vitro* proliferation of *Agave angustifolia* adventitious shoots. *Ciencia e Investigación Agraria*, 44(3), 288-289.
- Roca, W., & Mroginsky, L. (2000). En *Cultivo de Tejidos en la Agricultura* (pág. 70). Cali: CIAT.
- Saad, A., & Elshahed, A. (17 de 10 de 2012). Plant Tissue Culture Media. *Agricultural and Biological Sciences*, 30.
- Sadava, D., Purves, W., Heller, G., Orians, G., & Hillis, D. (2009). Elementos minerales requeridos por las plantas. En *Vida: La ciencia de la biología* (Octava ed., pág. 783). Buenos Aires, Argentina: Ed. Médica Panamericana.
- Sathyanarayana, & Verghese. (2007). Plant Tissue Culture Media. En *Plant Tissue Culture: Practices and New Experimental Protocols* (Primera ed., págs. 29-30). India: I. K. International Pvt Ltd.
- Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). Plantas de probeta. En *Nutrientes para las plantas probeta* (Primera ed., págs. 47-50). Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de La Plata.
- Silveira, Santos, Ferreira, Santos, & Silva. (2017). Chlorophyll Fluorescence in *Brachiaria decumbens* and *Brachiaria ruziziensis* submitted to Herbicides. *Planta Daninha*, 35, 3-4.
- Solarte, M., Moreno, L., & Melgarejo, L. (2010). Fotosíntesis y pigmentos vegetales. En *Experimentos en Fisiología Vegetal* (Primera ed., págs. 77-84). Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Soto, J., Piña, F., Sánchez, E., Pérez, R., & Basurto, M. (2016). Alternativas orgánicas para reducir la aplicación de nitrógeno en pacanas. *Revista Electrónica Nova Scientia*, 8(16), 141.
- Suárez, I., Jarma, A., & Avila, M. (20 de 11 de 2006). Development of an *in vitro* propagation protocol for roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC). *Revista temas Agrarios*, 11(2), 76-103.

- Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios. (07 de 2011). *Monografía de Cultivos*, 4. Santa Cruz Atoyac, Ciudad de México: SAGARPA. Obtenido de <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Estudios/Documents/monografias/brocoli.pdf>
- Trinidad, O., Vargas, J., Aldrete, A., López, J., & Fierros, A. (2015). Sustratos y tamaños de contenedor en el desarrollo de Hevea. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(31), 95-100.
- Tropicos. (2018). *Tropicos.org. Missouri Botanical Garden*. Obtenido de Name-*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck: <http://www.tropicos.org/Name/4102963>
- Vaca, I., & Landázuri, P. (2013). Evaluación de tres niveles de nitrógeno en medio de cultivo, en las fases de enraizamiento *in vitro* y adaptación a sustrato de *Rubus glaucus* (Benth). *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la vida*, 18(2), 52-53.
- Valdés, B., & Caballeros, A. (2015). Proceso de Fotosíntesis. En *Concepto de la botánica: consideraciones sobre los reinos*. (Primera ed., págs. 39-43). Sevilla, España: Universidad de Sevilla.
- Vidales, I. (11 de 2002). Efecto de reguladores de crecimiento en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana* Mill.). *Tesis Doctoral en Ciencias Agrícolas y Forestales. Universidad de Colima*. Colima, México.
- Villar, D., & Ortega, R. (01 de 2003). Bases Teóricas y su Aplicación para la Fertilización Nitrogenada en Cultivos. *Revista Agronomía y Forestal UC*, 4-8.
- Vilterhalter, D., Dragicèvic, I., & Vilterhalter, B. (2008). En *Potato in vitro Culture Techniques and Biotechnology* (Primera ed., págs. 20-39). Belgrado, Serbia: Global Science Books.
- Yussof, Wafa, & Taha. (2013). Plant regeneration and synthetic seeds production of *Brassica oleracea* var. *italica*. *Acta Horticulturae*, 958, 179-180.
- Zamora, E. (2016). *El cultivo de Brócoli*. Departamento de Agricultura y Ganadería. Sonora, México: Universidad de Sonora.