



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES SIGNIFICATIVAS PARA LA
MULTIPLICACIÓN IN VITRO DE DOS VARIEDADES DE ROSA (Rosa x
hybrida) CON MIRAS A UN PROCESO DE FLORACIÓN IN VITRO



AUTOR

María Gabriela Borja Coronel

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES SIGNIFICATIVAS PARA LA
MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE DOS VARIEDADES DE ROSA (*Rosa x
hybrida*) CON MIRAS A UN PROCESO DE FLORACIÓN *IN VITRO*

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

M.Sc Fernando Xavier Rivas Romero

Autora

María Gabriela Borja Coronel

Año

2017

DECLARACIÓN DEL DOCENTE GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Fernando Xavier Rivas Romero

Master en Biología Molecular y Celular de Plantas

CC: 171809270-1

DECLARACIÓN DEL DOCENTE CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Fabio Marcelo Idrovo Espín

Doctor en ciencias biológicas

CC: 170595225-5

DECLARACIÓN DE AUTORIA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos vigentes”.

María Gabriela Borja Coronel

CC: 172447845-6

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a la Universidad de las Américas (UDLA) por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de investigación en el laboratorio de Biotecnología Vegetal (LQ4)

A M.Sc Fernando Rivas por su tiempo, orientación, asesoramiento y dedicación durante todo mi proyecto de investigación.

A mis amigos pasantes y tesistas del laboratorio de Biotecnología Vegetal por su gran apoyo y amistad.

A mis padres por siempre apoyarme y enseñarme los mejores valores.

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo con todo mi corazón, a mi mamá Mónica por su amor, su apoyo, por siempre cuidarme y darme ánimos en todo momento de mi vida.

A mi papá Jaime por su confianza, su apoyo, por ser una guía y estar siempre a mi lado.

A mi hermano Jaime Andrés por ser una parte fundamental en mi vida.

A mis abuelitos Jaime, Mila, Carmen y Leonardo por su gran amor y por siempre ayudarme cuando lo necesito.

Les quiero mucho.

RESUMEN

Las rosas son plantas perennes, leñosas con flores grandes y coloridas, lo que las convierte en una de las plantas más populares y cotizadas del mundo. En Ecuador, las rosas son una de las plantas ornamentales con más demanda dentro del sector florícola. Sin embargo, a pesar de su cotización y de su interés comercial, las técnicas convencionales de propagación de rosas están ocasionando grandes pérdidas económicas a las florícolas y daños ambientales. Esto debido a las plagas y enfermedades típicas de la rosa cultivada en campo y al gasto excesivo de recursos hídricos y energéticos en su mantenimiento. Estas dificultades pueden ser superadas a través de técnicas de cultivo *in vitro*, por lo que el objetivo de este trabajo fue identificar las variables significativas para la multiplicación *in vitro* de brotes de dos variedades comerciales de *Rosa x hybrida* (“minirosa” e “híbrido de té”) con miras a un proceso de floración *in vitro*. Se desarrollaron tres etapas, que son: establecimiento de cultivo, identificación de variables significativas en la multiplicación brotes mediante un diseño Plackett-Burman y establecimiento de un protocolo de multiplicación de brotes. En el establecimiento del cultivo se evaluó distintas concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) y se determinó que el tratamiento de desinfección más viable es el tratamiento 3 (10% v/v de NaClO en 10 minutos) con un 50% y 63.3% de viabilidad en “minirosa” e “híbrido de té” respectivamente. En la segunda fase se evaluó el efecto de siete variables independientes (6-BAP, kin, ANA, KNO₃, KH₂PO₄, NH₄NO₃ y sacarosa) en la multiplicación de brotes de dos variedades de rosa mediante un diseño experimental de Plackett-Burman, y se determinó que las variables más significativas son el 6-bencilaminopurina (6-BAP) y la sacarosa. Finalmente en la tercera etapa se estableció un protocolo específico para multiplicación de brotes de ambas variedades de rosa, con las dos variables más significativas obtenidas en la segunda fase. Se determinó que el tratamiento TA (3 mg/L de BAP + 50 g/L de sacarosa + 0.1 mg/L de ANA) fue el mejor en cuanto a crecimiento del número de brotes, obteniendo un promedio de 12.7 brotes en “minirosa” y 9.3 brotes en “híbrido de té” a los 15 días.

ABSTRACT

Roses are perennial, woody plants with large and colorful flowers, making them one of the most popular and listed plants in the world. In Ecuador, roses are one of the ornamental plants with the most demand in the floricultural sector. However, in spite of their price and commercial interest, the conventional techniques of propagation of roses are causing great economic losses to floriculture companies and environmental damages. This is due to the typical pests and diseases of the rose cultivated in the field and the excessive expenditure of water and energy resources in their maintenance. These difficulties can be overcome through *in vitro* culture techniques, so the objective of this work was to identify the significant variables for the *in vitro* multiplication of shoots of two commercial varieties of *Rosa x hybrida* ("minirose" and "hybrid tea") in order to an *in vitro* flowering process. Three stages were developed: establishment of cultivation, identification of significant variables in the multiplication of shoots and establishment of a protocol of multiplication of shoots. Different concentrations of sodium hypochlorite (NaClO) were evaluated at the establishment of the culture and the most viable disinfection treatment was determined as treatment 3 (10% v / v NaClO in 10 minutes) with 50% and 63.3% of viability in "minirose" and "tea hybrid" respectively. In the second stage, the effect of seven factors (BAP, Kin, ANA, KNO₃, KH₂PO₄, NH₄NO₃ and sucrose) was evaluated by an experimental design of Plackett-Burman. In the shoot multiplication of two varieties of rose, being determined that the most significant factors are 6-benzylaminopurine (6-BAP) and sucrose. Finally in the third stage a specific protocol for shoots multiplication of both varieties of rose was established, with the two most significant factors obtained in the second stage. It was determined that the TA treatment (3 mg / L BAP + 50 g / L sucrose + 0.1 mg / L ANA) was the best in terms of shoot number growth, obtaining an average of 12.7 shoots in "minirose" and 9.3 shoots in "tea hybrid" after 15 days.

ÍNDICE

1. Capítulo I: Introducción.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Problemática.....	3
1.3. Justificación	5
1.4. Objetivos.....	6
1.4.1. Objetivo general:.....	6
1.4.2. Objetivos específicos:.....	6
2. Capítulo II: Marco teórico	6
2.1. Importancia del cultivo de rosa en Ecuador	6
2.2. Descripción taxonómica y botánica del rosal.....	7
2.3. Variedades en estudio.....	9
2.3.1. Híbrido de té	9
2.3.2. Miniatura.....	10
2.4. Morfología del rosal	11
2.4.1. Raíz	11
2.4.2. Tallo.....	12
2.4.3. Hojas.....	13
2.4.4. Flores.....	13
2.4.5. Fruto	14
2.6. Fisiología del desarrollo del rosal	15
2.6.1. Etapa de desarrollo vegetativo	15
2.7. Formas de propagación y cultivo convencional	18
2.7.1. Semilla.....	18
2.7.2. Estacas.....	19
2.7.3. Injertos.....	20
2.8. Multiplicación <i>in vitro</i>	21
2.8.1. Ventajas de la multiplicación <i>in vitro</i> de rosas	22
2.9. Factores que influyen en la multiplicación <i>in vitro</i>	22
2.9.1. Temperatura	23
2.9.2. Humedad	23

2.9.3.	Fotoperiodo	23
2.9.4.	Sales inorgánicas	24
2.9.5.	Fuente de carbono.....	26
2.9.6.	Reguladores de crecimiento vegetal.....	26
2.10.	Principales problemas con la multiplicación <i>in vitro</i>	28
2.10.1.	Contaminación.....	28
2.10.2.	Oxidación fenólica.....	30
2.11.	Diseño experimental Plackett-Burman.....	31
3.	Capítulo III: Diseño del plan experimental.....	31
3.1.	Fase I: Establecimiento de cultivo	32
3.2.	Fase II: Identificación de variables significativas con un diseño Plackett-Burman.....	33
3.3.	Fase III: Establecimiento de un protocolo específico de multiplicación de brotes.	35
3.4.	Análisis estadístico.....	37
4.	Capítulo IV: Procedimientos.....	38
4.1.	Población y muestra	38
4.2.	Obtención de los explantes.....	39
4.3.	Preparación de medios	39
4.4.	Fase I: Desinfección	40
4.5.	Fase II: Identificación de variables significativas	40
4.6.	Fase III: Establecimiento de un protocolo específico de multiplicación de brotes.	41
4.7.	Evaluación estadística de los resultados	41
5.	Capítulo V: Resultados y discusión	42
5.1.	Fase I: Establecimiento de cultivo	42
5.1.1.	Porcentaje de contaminación	42
5.1.2.	Porcentaje de necrosamiento	53
5.1.3.	Porcentaje de viabilidad.....	57
5.2.	Fase II: Multiplicación de brotes e identificación de variables significativas con un diseño experimental Plackett-Burman	61

5.2.1. Velocidad de crecimiento.....	61
5.2.2. Tasa promedio del número de brotes por tratamiento	67
5.2.3. Identificación de variables significativas	72
5.3. Fase III: Establecimiento de un protocolo específico de multiplicación de brotes.	77
6. Conclusiones y recomendaciones	81
6.1. Conclusiones	81
6.2. Recomendaciones.....	82
Referencias.....	83
Anexos.....	93

Capítulo I. Introducción

1.1. Antecedentes

La rosa es una planta de origen asiático, perenne, leñoso, del tipo arbustiva, con tallo generalmente espinoso que alcanzan de 2 a 5 m de altura. El género *Rosa* comprende más de 200 especies silvestres y aproximadamente 4 mil variedades que son el resultado de hibridaciones entre especies nativas derivando al apareamiento de nuevos cultivares de rosa. (Gostinchar, 2002, pp. 30). Se caracteriza especialmente por sus flores que poseen gran diversidad de tonos, colores, formas y tamaños. La rosa es la especie más conocida, cultivada y solicitada como flor cortada por parte de los consumidores, debido a su excelente plasticidad.

En Ecuador, el cultivo de rosas ha tenido una gran incidencia en la economía. Para el año 2009, las flores representaban el 25% del total de las exportaciones no tradicionales del Ecuador de todo el sector agrícola. (Dirección de inteligencia comercial e inversiones, 2013). De igual forma, el mercado interno de rosas cortadas en Ecuador crece cada año, esto debido a la preferencia de los consumidores por esta planta para decoración de todo tipo de ambientes.

Actualmente, las rosas comerciales son propagadas de forma asexual mediante técnicas convencionales de cultivo *in vivo*, como por ejemplo por semillas, injertos de varetas o a través de injertos de esquejes o estacas, siendo este último el método más empleado a nivel comercial (Yong, 2004, pp. 60-69). Se ha comprobado que esta técnica de propagación *in vivo* aprovecha la capacidad de algunas partes vegetales de reconstruir o formar órganos cuando se les proporciona condiciones específicas (Castilla, 2005, pp. 30-32). La propagación sexual de las rosas se realiza para el mejoramiento genético de nuevas variedades, a través de diversos procesos de cruzamiento y selección entre especies nativas (Yong, 2004, pp. 60-69). La rosa es cultivada generalmente en invernaderos que poseen condiciones físicas específicas para el desarrollo de la planta. Los invernaderos utilizados para la propagación de rosa requieren de una

alta tecnología; con sistemas de calefacción, control de humedad y temperatura. Los sustratos utilizados suelen ser inertes y están conformados a base de perlita con sistemas hidropónicos. El uso de estos invernaderos se justifica con el aumento de producción, además que minimiza los problemas derivados por climas y periodos desfavorables para el cultivo de rosa. (Xotla, P, 2010).

Por otro lado, en los últimos años se han implementado técnicas de cultivo *in vitro* para micropropagación de variedades comerciales de rosas a partir de tejidos u órganos vegetales y de esta forma solucionar algunos aspectos negativos de la propagación asexual en invernadero, como por ejemplo la muerte prematura, falta de espacio y gasto excesivos de recursos hídricos y energéticos. Existen algunos tipos de técnicas de cultivo empleadas para la micropropagación *in vitro* de rosas las cuales son: cultivo de yemas y brotes, callos y nodos. También existen técnicas de cultivo a través de protoplastos y cultivo de embriones pero debido a que estas técnicas presentan una mayor especificidad y complejidad son menos utilizadas para micropropagación *in vitro* de rosas (Castilla, 2005, pp. 30-32).

Se han realizado estudios previos acerca de la micropropagación *in vitro* de rosas y el establecimiento de protocolos eficientes para producir a gran escala cultivares de rosas. Por ejemplo en el año 2011 se realizó una investigación acerca de la micropropagación de *Rosa indica* con la finalidad de obtener ejemplares libres de enfermedades típicas de esta especie, a partir de meristemas nodales; los autores determinaron que en un medio de multiplicación que contenía sales Murashige y Skoog suplementado con 1-2.5 mg/L de 6-Benzilaminopurina (6-BAP) y kinetina se produjo la mayor cantidad de brotes (Hameed, N et al, 2011). Así mismo, estudios realizados para una tesis de grado en Guatemala en el año 2013, se evaluó la multiplicación y enraizamiento de brotes *in vitro*, de tres cultivares de rosa con diferentes proporciones de auxinas y citoquininas a partir de segmentos de hojas. Se determinó que el mejor medio de multiplicación de brotes tenía una composición de ácido 1-nalftalenacético (ANA) en una baja concentración y 6-Benzilaminopurina (6-BAP) en una concentración igual o mayor a 2.5mg/L (Portillo, 2013, pp. 45-56). La micropropagación de rosas usando hojas o yemas axilares y los requisitos

específicos en diferentes etapas del cultivo *in vitro* han sido ampliamente estudiados, pero sin resultados evidentes respecto a la obtención de flores *in vitro*, esto debido a que no se han realizado suficientes investigaciones orientadas a inducir la floración *in vitro* de rosas. Uno de los estudios más recientes acerca de la inducción de floración *in vitro* en variedades de rosas fue realizada en el año 2013 en Japón en el que se determinó las condiciones específicas para inducir floración *in vitro* en mini rosas rojas, empleando sustancias como el nitrato de plata y variando concentraciones de reguladores de crecimiento como el thidiazuron (TDZ), zeatina y nutrientes como nitrógeno, fósforo, calcio y potasio. Se estableció también rangos de temperaturas, fotoperiodos específicos y porcentajes de fuente de carbono en el medio de cultivo (Zeng et al., 2013, pp. 401-409).

Por lo anteriormente mencionado, se están implementando técnicas de cultivo *in vitro* que mejoren la calidad y producción de las rosas, incluyendo la multiplicación de brotes y la obtención de flores mediante establecimientos de protocolos específicos de multiplicación y floración *in vitro*.

1.2. Problemática

En Ecuador la floricultura de rosas es una actividad económica de suma importancia, debido a que es el cuarto país productor mundial de rosas y las rosas son el quinto producto de exportación en los últimos años (Vázquez, 2016, pp. 17). Así mismo, en el mercado interno del país el cultivo de rosas constituye un importante ingreso para la floricultura. El método más empleado para propagación asexual de rosas es mediante injertos de varetas y yemas. Los injertos de varetas son raramente utilizados para la producción comercial de rosas cortadas puesto que requiere de demasiado tiempo para el desarrollo de las plantas (Duarte, A, 2015). Los injertos de yemas es el método más utilizado a nivel comercial. Consiste en seleccionar un injerto de una planta sana y joven con raíces denominada patrón a la que se le realiza un corte debajo de un nudo o una hoja y se lo entierra en un compost con nutrientes adecuados para su crecimiento y desarrollo (Navarro y López, 2011, pp. 203-211). No obstante, esta

técnica tiene algunas desventajas como la incompatibilidad que se puede presentar en la unión entre el injerto y el patrón, ocasionando muertes prematuras, poca resistencia a enfermedades, crecimiento anómalo de la planta, obstrucciones del xilema y el floema, influyendo negativamente en el desarrollo de la planta. (SACSA, 2010). Otro inconveniente con esta técnica es al momento del trasplante, puesto que algunos autores mencionan que los híbridos de rosa tienen el sistema radicular bastante débil y pueden sufrir daños al momento de ser trasplantados, y de esta forma ocasionar la muerte de la planta (Sallinger, 1991, pp. 228-231).

Por otra parte, las rosas propagadas mediante injertos son cultivadas en invernaderos especializados para su desarrollo. Sin embargo, el uso de invernaderos presenta algunos inconvenientes tanto en el ámbito económico como ambiental. Por ejemplo: una inversión inicial alta, costos de producción elevados, alto nivel de capacitación del personal, entre otras (Bouzo y Gariglio, 2009, pp. 38-45). En la parte ambiental también se presentan algunas desventajas importantes. Los gastos de operación de un invernadero generan daños al ambiente debido al uso constante de electricidad, gas, agua, pesticidas y fungicidas. De igual forma, el sistema de riego para los cultivos genera un desperdicio de recursos hídricos y energéticos considerable, y por último el uso de pesticidas y fungicidas provoca problemas al ambiente generando aguas residuales (Taylor, J y Kittas, C, 2013).

Finalmente, el corto tiempo de vida de las rosas cortadas es un problema para los consumidores, puesto que las rosas cortadas duran tan solo aproximadamente una semana en un florero con un continuo cuidado (Schuch, U, 2014). De igual forma, el cuidado necesario de las rosas cortadas no compensa el trabajo y costo que genera producirlas, pues un ramo de rosas cortadas necesita un cambio de agua y poda diaria para evitar malos olores y marchitez.

1.3. Justificación

Las rosas son muy cotizadas comercialmente en Ecuador tanto como para exportación o dentro del mercado interno del país. Las rosas ecuatorianas se caracterizan por ser sinónimo de calidad en el mercado a nivel mundial, esto debido a sus llamativos colores, formas, tamaños y gran variedad de cultivares de rosas híbridas. Es por ello que es importante desarrollar técnicas de cultivo *in vitro* que puedan solucionar los problemas que se presentan con los métodos comunes de propagación *in vivo*, y sobre todo determinar cuáles son las condiciones físicas y químicas óptimas para la multiplicación *in vitro* de rosas. En este trabajo se propone identificar las variables significativas para la micropropagación *in vitro* de rosas mediante un diseño experimental de Plackett-Burman. Para esto se determina a través de un diagrama de Pareto, que variables tienen un mayor efecto positivo en la variable respuesta. Mediante la identificación de las variables más influyentes en el número de brotes de rosas, se puede establecer y optimizar un protocolo específico de multiplicación *in vitro* de brotes.

La micropropagación *in vitro* de brotes es una técnica innovadora para multiplicación de rosas, solucionando en gran medida los problemas asociados a la producción tradicional de rosas, tales como: ahorro de recursos energéticos, hídricos, espacio y sobre todo reduciendo la contaminación por fertilizantes y plaguicidas que producen los invernaderos de propagación masiva actualmente. Las ventajas más importantes de esta técnica son: micropropagación a gran escala de rosas libre de enfermedades, en corto tiempo y conservando su potencial genético y calidad sanitaria (Sri Rama et al., 2012, p. 1517-1536). Así mismo se puede obtener especies de rosas híbridas en cualquier época del año; facilita el cultivo de un gran número de plantas de rosas en un espacio reducido; se pueden controlar factores ambientales y nutricionales que no se pueden controlar en campo y se reducen los costos de producción de labores agronómicas en campo o invernadero (Randoux et al., 2014, pp. 457-501).

Por lo tanto, el cultivo *in vitro* es una alternativa tecnológica que permite la propagación clonal rápida de especies vegetales de interés que posean una baja tasa de multiplicación *in vivo*. A diferencia de las técnicas convencionales de propagación de rosas, el cultivo *in vitro*, permite la obtención de grandes volúmenes de cultivares en un menor tiempo y también el fácil manejo de las mismas en un espacio reducido.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general:

Identificar las variables significativas para la multiplicación *in vitro* de dos variedades de rosa (*Rosa x hybrida*).

1.4.2. Objetivos específicos:

- Desarrollar un protocolo de desinfección para el establecimiento de los explantes de yemas axilares de dos especies de rosa (*Rosa x hybrida*).
- Determinar las variables significativas para la multiplicación de brotes de dos variedades de rosas (*Rosa x hybrida*) mediante un diseño factorial Plackett-Burman.
- Establecer un protocolo específico para la multiplicación *in vitro* de dos variedades de *Rosa x hybrida*.

Capítulo II. Marco teórico

2.1. Importancia del cultivo de rosa en Ecuador

Ecuador tiene grandes ventajas en cuanto a la producción masiva de rosas. Esto gracias a la diversidad de climas, suelos y su posición geográfica. Las rosas son uno de los productos principales de exportación de Ecuador en los últimos años. A comienzos de los años 80 se inició el auge de exportación de rosas en Ecuador

y desde ese entonces tienen una incidencia importante en la economía del país, puesto que desde el ingreso de Ecuador en el mercado internacional, la rosa es el cuarto producto de exportación (Clerque, 2014, pp. 21-25). Este aspecto resulta positivo, ya que de esta forma se contribuye a la generación de plazas de empleo, desarrollo de tecnologías más eficientes en cuanto a riego y ahorro de recursos, además el beneficio social que genera en el sitio de instalación de la producción.

Por otro lado, la demanda internacional cada vez es más exigente, ya que el mercado solicita rosas limpias, grandes, resistentes pero sin el uso excesivo de agroquímicos como los plaguicidas o los fertilizantes químicos (Vázquez, 2016, p.17). Por tal motivo se buscan implementar nuevas técnicas de cultivo que satisfagan las necesidades del consumidor.

Las rosas ecuatorianas se caracterizan por su calidad, tallos gruesos, flores grandes y gran variedad de colores. En el año 2010, la exportación de rosas cubrían el 25% de las exportaciones no tradicionales y para el año 2015 las rosas representaban el 80% de la exportación de flores a países como Estados Unidos, Unión Europea, Rusia, Canadá, entre otros (Clerque, 2014, pp. 21-25).

2.2. Descripción taxonómica y botánica del rosal

La clasificación taxonómica de la rosa (*Rosa sp*) se divide de la siguiente manera:

Tabla 1:

Clasificación taxonómica de la rosa

Reino	Vegetal
División	Espermatofitos
Subdivisión	Angiosperma
Clase	Dicotiledónea
Orden	Rosales
Familia	Rosácea
Género	Rosa
Especie	<i>Rosa sp.</i>

Tomado de Yong, 2004, pp. 63.

El género *Rosa* comprende un gran número de especies arbustivas con florescencias, y es el principal representante de la familia Rosácea. Se denomina rosa a la flor y rosal a la planta (Erazo, H , 2011). Se caracteriza por tener una gran variedad de colores, formas y tamaños. En la actualidad la rosa es la planta ornamental más cultivada y solicitada como flor cortada por partes de los consumidores. (Bale, S y Durham, R, 2011)

Se han identificado aproximadamente 100 especies silvestres de rosa que son originarias en su mayoría de Asia y un número reducido de Europa, África y Norteamérica. Su uso varía dependiendo de la necesidad del consumidor y son cultivadas generalmente como plantas ornamentales por su atractivo y la fragancia de su flor. Sin embargo también se utiliza para la extracción de aceites esenciales para aéreas como perfumería, cosmética, medicina y gastronomía. (Bale, S y Durham, R, 2011)

Existen también una gran variedad de cultivares de rosas que son el resultado de procesos de cruzamiento y selección entre especies silvestres, que dan lugar al apareamiento de nuevas variedades de rosa cada año. Las especies progenitoras generalmente utilizadas para la obtención de variedades híbridas son; *Rosa multiflora*, *Rosa galica*, *Rosa arvensis*, *Rosa californica*, *Rosa moschata* y *Rosa chinensis* (Figura 1) (Gostinchar, 1954, pp.30). Actualmente las variedades comerciales son cultivares híbridos de especies desaparecidas. Los denominados “híbridos del té” y “floribunda” son los más utilizados para flor cortada. (Bale, S y Durham, R, 2011)



Figura 1: *Rosa chinensis*

Tomado de Wikipedia, 2010.

2.3. Variedades en estudio

En este estudio se utilizaron dos variedades de *Rosa x hybrida*: “Híbrido de té” y “minirosa”

2.3.1. Híbrido de té

El híbrido de té es la variedad híbrida más cultivada y comercializada. Es el resultado de cruzamientos entre especies silvestres como la *Rosa chinensis* o la *Rosa multiflora*. Es el tipo más comercial y son ideales para corte. Florecen generalmente dos veces al año, sin embargo cada año se forman nuevas variedades con tiempos de floración más prolongados. Tienen sensibilidad al frío y al invierno y crecen en temperaturas entre 22 a 25°C. (Figura 2). (Arzate, A., et al, 2014)



Figura 2: Variedad de rosa "hibrido de té".

Tomado de El Nourgarden, s.f.

2.3.2. Miniatura

La rosa miniatura (*Rosa x hybrida*) tiene tallos que alcanzan apenas los 30 o 40 centímetros. Tienen flores que forman ramilletes de entre 3 a 12 mini rosas simples o dobles. Poseen hojas pequeñas y florecen en verano y otoño. Cada vez existen más variedades rosa miniatura, puesto que sirven para decorar interiores, como cualquier planta de casa. (Figura 3). (Arzate, A., et al, 2014)



Figura 3: Variedad de rosa "rosa miniatura". (*Rosa x hybrida*).

Tomado de Plantaeflor, 2005.

2.4. Morfología del rosal

La familia de las Rosáceas incluye especies variadas, con tallos desde los 15 metros de altura hasta plantas trepadoras de 12 metros. El género *Rosa* se caracteriza por comprender plantas en su mayoría perennes, arbustivas, con tallos espinosos y con floración continua (Nagar, et al, 2007, p. 321-332).

2.4.1. Raíz

La raíz del rosal se origina de la radícula del embrión hasta formar una raíz definitiva en estado adulto. El rosal presenta una raíz principal y pequeñas ramificaciones secundarias que no alcanzan el tamaño de la raíz principal. Posee forma pivotante al diferenciarse a simple vista la raíz principal de las secundarias (Figura 4). (Bale, S y Durham, R, 2011)



Figura 4: Raíz pivotante de la rosa (*Rosa* spp).

Tomado de Garden centerejea, s.f.

2.4.2. Tallo

Según Nagar, P y colaboradores (2007) los rosales presentan tallos altos y erectos que pueden llegar a los 5 metros de altura. Poseen uno o más tallos principales y varios tallos secundarios que brotan de las ramas principales. Frecuentemente son provistos de formaciones epidérmicas denominadas “espinas o agujones”, que consisten en tejido sin vascularización que se encuentran a lo largo del tallo del rosal. De igual manera podemos encontrar los nudos, que son engrosamientos en donde se ubican las yemas de las cuales brotan hojas y ramas una vez desarrolladas. (Marco, M y Martinez, R, 2015)

Las yemas son los extremos jóvenes del tallo. Poseen tejido meristemático y también hojas jóvenes y primordios foliares. Se clasifican según su posición en el tallo y según su función. (Montenegro, A, 2016) Según su posición se clasifican en: yemas axilares que se encuentran en la unión entre el tallo y las hojas de la planta y se encarga de la formación de ramas y hojas y yemas apicales que se encuentran en el extremo de las ramas y se encarga del crecimiento vertical de la planta. Según su función se clasifican en: yemas foliares que dan lugar a la formación de hojas y yemas florales que dan lugar a la formación de flores (Figura 5) (Gostinchar, 1954, p. 25).



Figura 5: Tallo espinoso de la rosa (*Rosa* spp).

Tomado de Garden centerejea, s.f.

2.4.3. Hojas

Las hojas del rosal son compuestas y están conformadas de cinco a siete folíolos. La superficie de las hojas del rosal depende de la especie, puesto que algunas son brillantes y lisas y otras pueden ser rugosas con nervaduras profundas y matificadas. (Harrison, K et al, 2005)

Tienen una forma pinnada. Son hojas imparipinnadas, por tal razón las hojas del rosal siempre tendrán un número impar de folíolos (Nagar, et al, 2007, p. 321-332).

La disposición de las hojas en el tallo es alterna, es decir que las hojas no nacen en un mismo punto del tallo, sino cada una se desarrolla independientemente en su propio nudo (Figura 6) (Williams, H, 2013)



Figura 6: Hojas imparipinadas de la rosa (*Rosa* spp).

Tomado de Gardencenterejea, s.f.

2.4.4. Flores

La flor del rosal es generalmente aromática y se denomina rosa. Presentan flores solitarias que son hermafroditas (Marco, M y Martinez, R, 2015). Posee un cáliz dialisépalo, corola dipétala con 5 sépalos enteros, 5 pétalos o en algunas especies cultivadas pueden tener un número mayor de pétalos, debido a

transformación de los estambres; numerosos carpelos libres, varios estambres, estilos terminales libres o adheridos que forman una columna estilar. Las flores son periginias, es decir con el cálamo elevado alrededor del gineceo. (Silvestre, S y Monserrat, P, 2008). La corola de las rosas puede tener varias formas como por ejemplo; planas, en copa, redonda, cóncavas, en punta, en roseta, entre otras. (Figura 5). (Pujana, I, 2011)



Figura 5: Flor de la planta del rosal (*Rosa* spp)

Tomado de Garden centerejea, s.f.

2.4.5. Fruto

El fruto del rosal silvestre es un pomo que se denomina “escaramujo”, y se caracteriza por ser un fruto seco, pequeño que posee un contenido elevado de vitaminas. Son monospermos, duros y aparecen después de la floración de los rosales. (Gostinchar, J, 1954) Su cubierta es de color rojo intenso brillante y constituyen una nueva decoración. (Figura 6) (Harrison, K et al, 2005)



Figura 6: Fruto del rosal (Rosa spp).

Tomado de Garden centerejea, s.f.

2.6. Fisiología del desarrollo del rosal

Los rosales son plantas que florecen continuamente. Estas floraciones varían cada vez en cantidad y calidad de la flor, presentando diferentes periodos de desarrollo. Las yemas apicales o las yemas situadas en la parte superior del tallo de la planta, con frecuencia son consideradas más reproductivas, mientras que las yemas situadas en la base de la planta son más vegetativas. (Espinosa, E, 2015) .El ciclo de desarrollo del rosal se cree es ilimitado, puesto que cada año se producen tejidos vegetativos nuevos y crecen ramas jóvenes. (Bale, S y Durham, R, 2011).

2.6.1. Etapa de desarrollo vegetativo

En el periodo vegetativo se produce la inducción de brotes mediante las yemas axilares y también el desarrollo de la yema floral, donde las hojas y el tallo se tornaran de un color rojizo (Tipan, 2015, p. 41-58).

Las yemas axilares suelen tener periodos cortos o prolongados de latencia y, para que la yema empiece a generar brotes se debe de romper ese estado de latencia. Esto produce una disminución casi completa de los procesos fisiológicos dentro de la yema que hacen que permanezca en ese estado durante largos periodos (Tipan, 2015, p. 41-58).

Este periodo de latencia de las yemas axilares se debe a la dominancia de las yemas apicales de la planta. La dominancia apical, según Yong (2004, p. 62) es una propiedad que poseen la mayoría de las plantas en donde los ejes terminales son más activos biológicamente, al presentar respuestas fisiológicas más fuertes, en comparación a otras zonas de la planta. En las zonas apicales de la planta existe una mayor y continúa división celular lo que genera el crecimiento primario de las plantas, debido a esto la mayoría de nutrientes y enzimas actúan mejor en la parte apical del tallo. (Harrison, K et al, 2005)

La dominancia apical genera una latencia en las yemas axilares, debido a la producción de auxinas en el tejido meristemático de la zona apical del tallo (Espinosa, E, 2015). El estrés, cambios climáticos y la poda son factores que pueden eliminar la dominancia apical para dar lugar a la formación de brotes. Según manifiesta Pujana (2011, pp. 76), las yemas axilares son estructuras que dan lugar a la brotación de yemas y desarrollo del tallo. La yema axilar alberga a un vástago joven en estado embrionario que posee tejido meristemático, el cual se encuentra cubierto por hojas jóvenes y a su vez la yema axilar está rodeada por hojas denominadas escamas, que son las que permiten que entre en estado de latencia.

A medida que se vaya rompiendo el estado de latencia y se reduzca la dominancia apical, la concentración de auxinas en las hojas inmaduras de la zona apical disminuirá y la concentración de citoquininas aumentará, generando así la brotación de yemas (Yong, A, 2004, pp. 67). Un brote de yema desarrollado tiene que tener una longitud de al menos 10 mm y estar en crecimiento constante. (Williams, H, 2013, pp.97)

2.6.2. Etapa del desarrollo reproductivo o floración

En el periodo reproductivo se desarrolla el botón floral que va da lugar a la rosa, donde las hojas y el tallo se tornaran de un color rojizo a un color verde. Cuando la planta alcanza el estado reproductivo, los meristemos apicales del tallo dejan de formar hojas normales y comienzan a desarrollar primordios florales. En este proceso los meristemos apicales pasan a tener un tipo de crecimiento determinado. Las plantas perennes como las rosas florecen varias veces, dependiendo de la longevidad de la especie. En el rosal, generalmente la flor se origina en el ápice del vástago principal. (Esau, K, 1988, pp.76-78)

Los órganos de la flor se originan por la división y diferenciación de las células. Las divisiones trasforman al primordio floral en un botón floral. En primera instancia, el crecimiento de los sépalos y los pétalos de la rosa en su iniciación y desarrollo, se parece al de las hojas normales. Por último la formación de los carpelos, dan lugar al desarrollo del gineceo. (Erazo, H , 2011)

Por otro lado, existen algunos factores que pueden ocasionar un aborto floral o interrupción en el desarrollo del botón floral. Entre estos están la especie, del crecimiento del brote, la posición de la yema en el tallo, desequilibrios nutricionales, cambios ambientales, etc. Sin embargo los factores más importantes que influyen en que ocurra o no un aborto floral son la luz y las hormonas. (Williams, H, 2013)

Los botones florales pasan por cuatro estadios antes de la cosecha o corte de la rosa (Nagar et al., 2007, p. 329). Estos estadios son: Estadio “arroz” en el cual el diámetro del botón floral es igual o menor que 0,4 cm; estadio “arveja” en el cual el diámetro del botón floral está en un rango de 0,5 a 0,7cm; estadios “garbanzo” en el cual el diámetro del botón floral se encuentra en un rango de 0,8 a 1,2 cm y estadio “rayo color”, en este estadio los sépalos se separan ligeramente, dejando observar el color de los pétalos de la rosa (Figura 7). (López, et al., 2008, p. 98-105)



Figura 7: Estadios de los botones florales del rosal (*Rosa* spp) (de izquierda a derecha): Estadio “arroz”, estadio “arveja”, estadio “garbanzo” y estadio “rayo color”.

Tomado de López, et al., 2008, p. 101.

2.7. Formas de propagación y cultivo convencional

Las rosas se pueden propagar mediante tres formas distintas que son: 1) Por semilla, 2) estacas o 3) injertos. Cada método tiene distinta importancia y uso específico.

2.7.1. Semilla

La propagación por semilla no es tan usada por parte de los agricultores, puesto que su uso generalmente es para la obtención de nuevas variedades de rosa a través de los procesos de cruzamientos y selección entre especies silvestres y especies modernas. Este método no se usa para producción a gran escala debido a que las plantas obtenidas por semilla varían sus características genéticas. (Figura 8) (Yong, A, 2004, p.327)



Figura 8: Método de cultivo de rosas (*Rosa spp*) en tierra mediante semillas.

Tomado de E Imundo, 2008.

2.7.2. Estacas

Este método de propagación ha alcanzado bastante popularidad, debido a la simplicidad de la técnica. Es un tipo de propagación asexual y consiste en separar de la planta madre un fragmento de tallo, hoja o raíz y posteriormente se siembra en tierra en condiciones favorables, donde se inducen la formación de raíces y de esta forma se obtiene una planta completa identifica a la progenitora. La parte de la planta más utilizada son los tallos, puesto que poseen bastante tejido no diferenciador que permite la diferenciación de las raíces. (Figura 9). (Cárdenas y Navarro, 2011, p. 86-93)

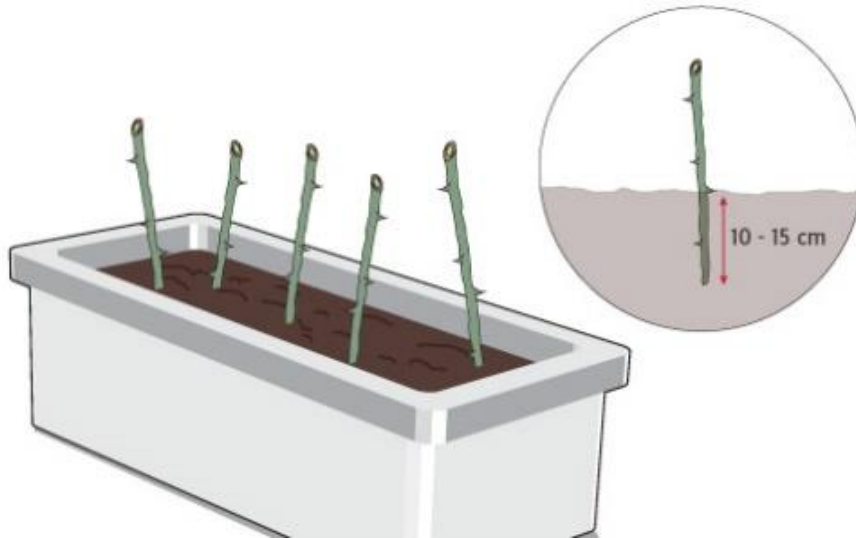


Figura 9: Método de propagación de rosas (*Rosa* spp) mediante el cultivo de estacas o yemas de la planta madre en tierra.

Tomado de El huerto20, s.f.

2.7.3. Injertos

La propagación por injerto es el método más usado comercialmente. Consiste en la unión de dos partes de plantas distintas para la obtención de una nueva planta. Este proceso se realiza insertando una yema de una planta con cualidades seleccionadas en el tronco o “porta injertos” de otra, denominada “patrón” el cual formara las raíces de la nueva planta. Se desarrollaran los órganos vegetales como flores, hojas y tallos iguales a la variedad de donde se obtuvo la yema. (Figura 10). (García, D, 2015)



Figura 10: Método de propagación en tierra de rosas mediante injertos de yema.

Tomado de Norfipc, 2007.

2.8. Multiplicación *in vitro*

La multiplicación *in vitro* es una técnica de cultivo de tejidos que induce el crecimiento vegetativo a nivel de meristemo en condiciones asépticas, generando una serie de cambios como el crecimiento del tallo, cambio en la forma de las hojas, desarrollo de nuevos brotes, entre otros. La multiplicación de brotes comprende cambios en el desarrollo vegetativo, como la formación de hojas y tallos e incluso cambios en la etapa reproductiva con la formación de flores y semillas. (Montero, W y Jimenez, V., 2009) Para que la formación de yemas axilares se produzca, la planta deberá generar un alto grado de reservas, por lo que se han desarrollado mecanismos para inducir la multiplicación de brotes en periodos favorables para la planta. La inducción de brotes depende de señales internas de algunos factores como son el fotoperiodo y temperatura. Una señal química emitida por factores que inducen la multiplicación, eleva los niveles endógenos en los meristemos e inhibe la biosíntesis de sustancias que bloquean la formación de brotes. (Afanador, A, 2005, pp. 340-356)

2.8.1. Ventajas de la multiplicación *in vitro* de rosas

La ventaja principal de la multiplicación *in vitro* es la obtención de plantas de rosa en condiciones asépticas, ahorro de recursos e incluso la obtención de rosas hasta su etapa de floración. Con esta técnica se puede inducir el crecimiento de rosas en cualquier época del año, bajo condiciones específicas. También se puede producir masivamente clones de cualquier variedad de rosa, en corto tiempo conservando su potencial genético y calidad sanitaria. Esto debido a que se puede realizar la propagación *in vitro* de cualquier variedad de rosa que posea características deseadas y valoradas comercialmente, como su tamaño, color, forma, entre otros, y producir clones genéticamente idénticos que conserven todas las cualidades requeridas de la variedad (Weldt, S, 2008, p.78-98). Así mismo, se obtendrán plantas libres de enfermedades y plagas típicas de la rosas, puesto que se cultivaran en condiciones asépticas. Otra ventaja importante es que se pueden cultivar un gran número de rosas *in vitro* en espacios pequeños y también optimizar el uso de factores ambientales y nutricionales. (Bale, S y Durham, R, 2011)

2.9. Factores que influyen en la multiplicación *in vitro*

La multiplicación *in vitro* puede ser inducida en cualquier estadio del desarrollo de la planta, esto depende de algunos factores internos (hormonales y nutritivos) y externos (fotoperiodo, temperatura, humedad) que se encargan de emitir señales a nivel meristemático con lo cual se producirá la diferenciación del meristemo vegetativo y a largo plazo a un meristemo reproductivo, dando lugar a la floración de la rosa. (Cárdenas y Navarro, 2011, p. 416-433). Los factores internos y externos que inducen la multiplicación *in vitro* de la rosa son:

2.9.1. Temperatura

La temperatura es un factor interno crítico para la estimulación del crecimiento de la rosa *in vitro*. Muchas variedades de rosas en fase de crecimiento vegetativo no se desarrollan correctamente sin la temperatura adecuada que generalmente esta entre los 25 a 28°C. (Zeng, et al., 2013, p. 401-409) La temperatura óptima de la planta depende del estado de desarrollo de la planta, ya que la planta posee características biológicas especiales que le permiten establecer su sensibilidad a la temperatura. (Portillo, G, 1999, p. 235-242)

2.9.2. Humedad

La humedad es un factor físico que representa la cantidad de agua o de vapor de agua que se encuentra en el interior de un cuerpo o en el ambiente. La humedad relativa en cambio es la relación entre la cantidad de vapor de agua que presenta una masa de aire y la máxima que podría alcanzar. (Cárdenas y Navarro, 2011, p.416-433). La humedad relativa es un factor físico importante en el cultivo *in vitro* de rosas, puesto que alcanza un porcentaje cercano al 100% dentro del recipiente en condiciones *in vitro*. Debido a esto el potencial hídrico entre el ambiente y el sustrato es negativo o casi cero, por lo cual no existe un gradiente para que la planta pueda tener mecanismos de transpiración. Es importante mantener la humedad relativa en un porcentaje entre 60 y 80% para que no ocurra la hiperhidratación de los tejidos. (Afanador, A, 2005, p. 340-356)

2.9.3. Fotoperiodo

El fotoperiodo son intervalos de luz a los que está expuesta la planta durante el día. Se ha comprobado en varios estudios que la diferenciación en los periodos de luz influye en la formación de yemas debido a la acción de hormonas internas de crecimiento (Wang, G., et al, 2002, 231-242). Los foto receptores de la planta como los fitocromos, tienen la capacidad de diferenciar entre luz y oscuridad y también la duración de estas fases (Krzymuski, M, 2016, pp. 76-95). Los

fotoperiodos recomendables para el cultivo *in vitro* de rosas son de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. (Hong Vu, N., et al, 2006, pp. 322-337)

Se ha demostrado en estudios que la sensibilidad a la luz de las plantas también varía durante su desarrollo. Conforme avanzan hacia la madurez, las plantas aumentan o disminuyen su sensibilidad al fotoperiodo (Wang, G., et al, 2002, 231-242).

2.9.4. Sales inorgánicas

Las sales inorgánicas brindan los macro y micronutrientes al medio de cultivo donde se desarrolla la planta. Los macronutrientes se encuentran en concentraciones altas, superiores al 0.1% de la materia seca. (Harrison, K et al, 2005) Los macronutrientes primarios son potasio, nitrógeno y fósforo y los macronutrientes secundarios son calcio, azufre y magnesio. Las funciones de los macronutrientes primarios en el medio de cultivo son:

El potasio en las plantas activa las enzimas necesarias para la síntesis de ATP (Adenosin trifosfato) y también brinda rigidez a los tejidos y estimula la síntesis de carbohidratos. También participa en el cierre y apertura de los estomas de las hojas, producción de clorofila y en el proceso osmótico de la planta. El potasio actúa en conjunto con las giberelinas para la elongación y turgencia celular. Se ha demostrado en algunos estudios que al aumentar la concentración de potasio en el medio induce la floración *in vitro* de rosas. (Texeira, D. , 2010)

El nitrógeno es un compuesto esencial en varias macromoléculas orgánicas de la planta como son proteínas, clorofila, aminoácidos, enzimas, ácidos nucleicos, entre otros. Se ha visto que una nutrición nitrogenada en la planta estimula el crecimiento de raíces, tallos, hojas, y flores. (Suarez, R, 2016). Sin embargo se ha demostrado que altas concentraciones de nitrógeno en el medio reduce la formación de brotes *in vitro*. Por tal razón el cociente entre las concentraciones $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ es un factor importante a la hora de formular el medio de cultivo, puesto que mientras mayor sea el cociente entre las concentraciones de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ menor será el porcentaje de multiplicación de brotes *in vitro*, así

mismo a menor concentración de NH_4^+ en el medio mayor será el porcentaje de multiplicación. (Zeng, S.J., et al, 2013)

El fósforo también forma parte estructural de algunos compuestos orgánicos importantes para la planta como nucleótidos, algunas proteínas y enzimas. Forma parte de los fosfolípidos de la membrana celular y actúa como un buffer para mantener constante el pH de la pared celular. De igual forma, el fósforo interviene en el crecimiento, multiplicación de brotes y en la floración de la planta. (Texeira, D. , 2010)

Por otro lado los micronutrientes, denominados también oligoelementos, se encuentran en cantidad mucho menor a los macronutrientes y no sobrepasan el 0.01% de la materia seca. Estos son: manganeso (Mn), zinc (Zn), hierro (Fe), cloro (Cl), molibdeno (Mb), boro (B), cobre (Cu), yodo (I). Los micronutrientes son necesarios para una adecuada actividad metabólica de la planta (Horibe, T y Yamada, K., 2015). Cumplen diferentes funciones en las plantas como por ejemplo, el Mn y Fe participan en la síntesis de clorofila en el funcionamiento de los cloroplastos. El Fe forma parte de la composición de los citocromos y ferredoxina. También el hierro es añadido al medio en forma de quelato el cual junto con el EDTA forma un anillo metálico, que en bajas concentraciones es capaz de estimular el crecimiento vegetativo. (Cárdenas-Navarro, R, 2011) El Cu y el Zn en conjunto participan en la oxidación de compuestos fenólicos. Igualmente, el Zn actúa en la formación de triptófano, un precursor del ácido indolacético (AIA) y controla la ribonucleasas lo que permite la síntesis de proteínas en caso de estrés de la planta en el medio de cultivo. El boro participa en la actividad meristemática de la planta y en la formación de bases nitrogenadas. (Wang, G., et al, 2002)

El medio de cultivo más comúnmente usado para cultivo *in vitro* de rosas, es el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (Anexo 1). Fue desarrollado en 1962 por los científicos Toshio Murashige y Folkie K. Skoog los cuales realizaron diversas investigaciones acerca de nuevos reguladores del crecimiento vegetal *in vitro*. (Murashige, T y Skoog, F, 1962).

2.9.5. Fuente de carbono

Las células de los tejidos vegetales cultivados *in vitro* son en su mayoría heterotróficas, por lo que es necesario agregar carbohidratos, que actúan como fuente de energía y aumentan el potencial osmótico en el medio de cultivo. La fuente de carbono más usada es la sacarosa en concentraciones de 2 a 4% (p/v), debido que es el carbohidrato más fácil de metabolizar por las plantas. (Ertola, J., et al, 2015). Los azúcares en el medio de cultivo, tienen la capacidad de estimular el crecimiento, incrementando la producción de metabolitos. Otras fuentes de carbono utilizadas son, la glucosa, fructuosa, lactosa y maltosa. (Weldt, S, 2008)

Algunos investigadores han determinado que la concentración de la fuente de carbono en el medio influye en el crecimiento y desarrollo de la rosa *in vitro*. Se estableció que los niveles de sacarosa adecuados en cuanto a la formación de brotes son entre 3 y 5% , generando un número mayor de brotes mientras mayor es la concentración de sacarosa en el medio (Weldt, S, 2008). Sin embargo, también se determinó que concentraciones superiores a 10% pueden inhibir la producción de metabolitos y afectar al desarrollo de la rosa *in vitro*. (Ertola, J., et al, 2015).

2.9.6. Reguladores de crecimiento vegetal

Los reguladores del crecimiento vegetal son sustancias orgánicas naturales o artificiales que controlan los procesos de desarrollo y crecimiento de la plantas. El efecto de los reguladores de crecimiento depende de algunos factores como son de la especie vegetal, estado de desarrollo de la planta concentraciones endógenas y exógenas del regulador y factores ambientales. Por lo tanto, no se puede establecer una función de los reguladores de crecimiento vegetal en el desarrollo de un tejido en específico. (Salisbury, F., y Ross, C, 1994)

Los reguladores de crecimiento más utilizados en la multiplicación *in vitro* de rosas, se clasifican según su estructura y función como: Auxinas, Citoquininas y Giberelinas.

Las auxinas son un grupo de fitohormonas que se encargan de producir la división y elongación celular, al aumentar la plasticidad de la pared celular. También promueven la dominancia apical, crecimiento de los órganos florales e inhiben el desarrollo de yemas axilares. Las auxinas más usadas son AIA (ácido indolacético), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y ANA (ácido naftalenacético). Para el cultivo *in vitro* de rosas la auxina más utilizada es ANA, puesto que tiene un efecto inhibitorio menor en la formación de yemas axilares en concentraciones bajas de 0.1 a 0.5 mg/L, además que es muy fuerte y estable. (Uribe, M., et al, 2008).

Las citoquininas son reguladores de crecimiento vegetal derivados de la adenina, que se encargan de promover la diferenciación y división celular, retrasa la senescencia en las hojas, inhibe la dominancia apical, activa la formación de yemas axilares e interviene en la formación y desarrollo floral. Se clasifican en sintéticas, naturales y fenilureas. La fitohormona BAP (6 bencil adenina purina) y Kinetina son citoquininas sintéticas, la zeatina y 2-iP (N-isopentil adenina) son naturales y el TDZ (tidiazuron) son citoquininas fenilureas. (Uribe, M., et al, 2008).

Se han realizado estudios comparativos de la eficiencia entre dos o más citoquininas en el cultivo *in vitro* de rosas. Por ejemplo en un estudio realizado por (Careli, B., y Echeverrigaray, S, 2002) se estableció que la citoquinina BAP en concentraciones entre 2 a 4 mg/L desarrollaron más brotes de yemas axilares que con la kinetina en iguales concentraciones, en cultivares de *Rosa x hybrida* y se determinó que a mayores concentraciones de BAP y kinetina en el medio la inducción de brotes se inhibe y se activa el enraizamiento y a menores concentraciones no se producen formación de brotes. (Careli, B., y Echeverrigaray, S, 2002).

A su vez, en una investigación realizada, se determinó que el TDZ es útil para la inducción de la floración *in vitro* de rosas. La combinación de TDZ en

concentraciones de 0.5 a 1 mg/L en combinación con concentraciones bajas de ANA (0.1 a 0.2 mg/L) incremento a un 49% el desarrollo de flores en la variedad de rosa Orange Parade. (Wang, G., et al, 2002).

Las giberelinas (GAs) son fitohormonas tetracíclicas naturales que son producidas en la zona apical del tallo de la planta. Sus funciones son estimular el crecimiento y elongación del tallo, permite que la planta pase de un estado juvenil a un estado adulto, influyen en la floración y promueven la germinación de semillas (Salisbury, F., y Ross, C, 1994). Sin embargo, en el cultivo *in vitro* de rosas, el uso de giberelinas no está muy difundido. En un estudio realizado por (Cardenas, J., et al, 2009) obtuvieron un número mayor de explantes con flores *in vitro*, en un medio de cultivo sin giberelinas y solo con una concentración de 1 mg/L de BAP. Las giberelinas más comunes son GA1, GA3, GA4 y GA7. (Salisbury, F., y Ross, C, 1994)

2.10. Principales problemas con la multiplicación *in vitro*

2.10.1. Contaminación

La contaminación microbiana es uno de los problemas más graves de la multiplicación *in vitro*, puesto que produce grandes pérdidas de material vegetal. Se puede originar de dos fuentes: a) microorganismos que se encuentran en la superficie o en los tejidos de los explantes (endófitos), b) microorganismos introducidos por deficiencias en la manipulación de los operadores en el laboratorio. (Hernandez, Y., y Gonzalez, M, 2010).

Los principales microorganismos que se encuentran en la superficie de los explantes son hongos, bacterias, levaduras y micoplasmas. Se albergan generalmente en tejidos senescentes, ceras, entre otros. Los microorganismos también se concentran en hendiduras, pelos, o desarrollarse en residuos de insectos. Además los microorganismos pueden venir de la planta madre, la cual puede estar contaminada con alguna plaga o estresada lo que provoca la formación de hongos y bacterias en los explantes como las yemas axilares.

También se pueden encontrar microorganismos endófitos que colonizan los tejidos vegetales de la planta, e infectan tejidos espacios intracelulares y tejidos vasculares. (Couselo, J., et al, 2010).

Los microorganismos introducidos en el laboratorio pueden encontrarse en el suelo o en el ambiente y también pueden ser habitantes de la microbiota del cuerpo humano y ser introducidos en el medio de cultivo por mal manejo en el laboratorio, condiciones higiénicas o incumplimientos en la disciplina tecnológica. (Hernandez, Y., y Gonzalez, M, 2010)

Para evitar la contaminación de los explantes por microorganismos introducidos en el laboratorio o por microorganismos endófitos o de superficie, se debe realizar una desinfección superficial con jabón, etanol (70%) y cloro (10-15%). El jabón rompe la tensión superficial de los explantes, mientras el etanol y el cloro eliminan los hongos y bacterias superficiales. También se utiliza un agente tenso activo como el Tween 20 en pequeñas cantidades.

Los géneros de hongos filamentosos generalmente encontrados en el medio cultivo son: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium* y *Penicillium*. Los géneros de bacterias comúnmente encontrados son *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Corynebacterium*. (Hernandez, Y., y Gonzalez, M, 2010)

2.10.2. Oxidación fenólica

La oxidación fenólica es el oscurecimiento del tejido que genera necrosis, inhibición de crecimiento y muerte del explante. La oxidación fenólica provoca problemas en el establecimiento y supervivencia de los meristemas debido a que produce un oscurecimiento en el explante que se extiende a todo el medio de cultivo debido a la oxidación y puede provocar necrosis y muerte del tejido vegetal. (Azofeifa, A, 2009, p. 153-175)

La oxidación fenólica se produce por daños en el tejido vegetal, ya sea por una herida o por la exposición prolongada en químicos fuertes como el cloro que produce que el tejido se necrose. Cuando los tejidos son dañados se acumulan compuestos fenólicos en grandes cantidades en las vacuolas de las células. Los compuestos fenólicos se mezclan con el contenido de otros orgánulos,

produciendo una oxidación y como consecuencia aparece el color negro o marrón. Estos compuestos son altamente reactivos e inhiben la actividad enzimática del explante. (Preece, J. y Compton, M., 1991)

Las prácticas más comunes para evitar la oxidación fenólica es, usar bajas concentraciones de compuestos químicos fuertes (cloro) para desinfectar el explante, añadir un antioxidante en el medio de cultivo, cambios frecuentes del medio de cultivo, entre otros.

Algunos agentes químicos, como el hipoclorito de sodio, pueden causar oxidación fenólica al momento de la desinfección de los explantes para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

2.11. Diseño experimental Plackett-Burman

El diseño factorial Plackett-Burman fue descrito en el año 1946 por Robin L. Plackett y J.P Burman. Su objetivo fue encontrar diseños experimentales que demuestren o investiguen la dependencia de algunas variables independientes, con distintos niveles de concentración, de tal manera que la varianza de estas dependencias se reduzca, utilizando un número limitado de experimentos. Este diseño se utiliza para evaluar el efecto conjunto de varios factores sobre la variable respuesta en dos niveles de variación. (Plackett, R., y Burman, J, 1946)

El diseño factorial Plackett-Burman evalúa dos niveles de $K=N-1$ variables, en N ensayos, donde N tiene que ser un múltiplo de 4. En comparación con el diseño de Plackett-Burman, un diseño experimental completo evalúa el efecto de todas interacciones posibles de los niveles de cada variable independiente en la variable respuesta. Un problema de los diseños experimentales completos es que el número de experimentos es proporcional al número de factores, lo cual se genera un número alto de réplicas por cada experimento. (Media, M., De la Garza, H., Aguilar, N., 2011)

El diseño factorial Plackett-Burman es fundamental al comienzo de un trabajo experimental donde se desconocen los factores que tienen más influencia sobre la variable respuesta, también sus niveles de influencia y las interacciones entre factores. Cuando se tiene un diseño experimental con más de 3 factores, es

posible una simplificación del diseño mediante Plackett-Burman, suponiendo que ciertas interacciones de orden 3 o superiores sean despreciables. (Palacios, S, 2008)

El diseño Plackett-Burman se utiliza en las primeras etapas de un experimento donde se necesite analizar varias variables y es probable que algunas variables tengan poco o ningún efecto sobre la variable respuesta. Se realiza un diagrama de Pareto para establecer que variables son significativas. Posteriormente las variables que se identifiquen como significativas serán analizadas con un diseño factorial completo y estimular los puntos óptimos. (Palacios, S, 2008)

		Factors						
		A	B	C	D	E	F	G
Treatment Combinations	1	+	-	-	+	-	+	+
	2	+	+	-	-	+	-	+
	3	+	+	+	-	-	+	-
	4	-	+	+	+	-	-	+
	5	+	-	+	+	+	-	-
	6	-	+	-	+	+	+	-
	7	-	-	+	-	+	+	+
	8	-	-	-	-	-	-	-

Figura 11: Ejemplo de matriz de combinaciones de un diseño factorial Plackett-Burman con 7 variables independientes (Columnas de la A-B) con dos niveles de variación (+,-) y 8 tratamientos (Filas 1-8)

Tomado de Plackett, R., y Burman, J, 1946.

Capítulo III: Diseño del plan experimental

Este trabajo consta de 3 fases principales para ambas variedades de *Rosa x hybrida* (minirosa e híbrido de té). En primer lugar la fase de establecimiento de cultivo mediante un diseño completamente al azar; en segundo lugar la fase de identificación de las variables significativas mediante un diseño factorial Plackett-Burman y por último, la tercera fase es el establecimiento de un protocolo

específico de multiplicación de brotes para *Rosa x hybrida* mediante un diseño factorial 2x2.

3.1. Fase I: Establecimiento de cultivo

En la primera etapa, se implementó un diseño experimental completamente al azar (DCA). Para el desarrollo del diseño DCA y las variaciones en las concentraciones de hipoclorito de sodio para cada tratamiento, se basó de un estudio similar realizado por Alev y Orhan (2016, p. 56-75) los cuales evaluaron distintas concentraciones y tipos de desinfectantes químicos en explantes de una variedad de rosa arbustiva “Heritage”.

En el presente estudio se realizaron 4 tratamientos para cada variedad de rosa con 10 repeticiones cada uno, modificando la concentración de hipoclorito de sodio entre cada tratamiento (Tabla 2). Como variables dependientes, se evaluó mediante observación de cada unidad de experimental (tubo de ensayo con un explante), el porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica a los 7 y 15 días y el porcentaje de necrosamiento y viabilidad (explantes supervivientes no contaminados ni necrosados) a los 15 días después de la siembra.

Los porcentajes de contaminación bacteriana, fúngica y total se calcularon mediante las siguientes fórmulas: (Rama Sri, K et al, 2012, p.1517-1536)

$$\% \text{ de contaminación bacteriana} = \frac{\# \text{ frascos cont Bact}}{\# \text{ frascos totales}} * 100 \quad (\text{Fórmula 1})$$

$$\% \text{ de contaminación fúngica} = \frac{\# \text{ frascos cont Fung}}{\# \text{ frascos totales}} * 100 \quad (\text{Fórmula 2})$$

$$\% \text{ de contaminación total} = \frac{\# \text{ frascos cont bact} + \# \text{ frascos cont fung}}{\# \text{ frascos totales}} * 100 \quad (\text{Fórmula 3})$$

Los porcentajes de necrosamiento y viabilidad se calcularon con las siguientes formulas:

$$\% \text{ de necrosamiento} = \frac{\# \text{ explantes necrosados}}{\# \text{ explantes sobrevivientes no contaminados}} * 100 \quad (\text{Fórmula 4})$$

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\# \text{ frascos necrosados} + \# \text{ frascos contaminados}}{\# \text{ frascos totales}} * 100 \quad (\text{Fórmula 5})$$

Tabla 2:

Tratamientos para la desinfección de explantes de yemas axilares

Tratamientos	Descripción
Tratamiento 1	2.5% hipoclorito de sodio
Tratamiento 2	5% hipoclorito de sodio
Tratamiento 3	10% hipoclorito de sodio
Tratamiento 4	15% hipoclorito de sodio

Nota: Los tratamientos de la fase de desinfección fueron elaborados mediante un diseño DCA, la variable independiente es la concentración de hipoclorito de sodio y las variables respuesta el porcentaje de contaminación, necrosamiento y viabilidad. Se realizó 10 réplicas por cada tratamiento con un explante por repetición para cada variedad de Rosa x hybrida.

3.2. Fase II: Identificación de variables significativas con un diseño Plackett-Burman

Para el desarrollo de la segunda fase, se implementó un diseño factorial Plackett-Burman (Plackett, R., y Burman, J, 1946), el cual consistió en 8 tratamientos con dos niveles y 7 variables independientes (Tablas 3 y 4). Se realizó 3 repeticiones por tratamiento para ambas variedades. Las variables respuesta evaluadas son la velocidad de crecimiento (mm.día^{-1}) a los 15, 30 y 45 días y la tasa promedio de multiplicación de brotes a los 45 días. Las variables se evaluaron mediante medición manual de la altitud de los explantes por tratamiento (velocidad de crecimiento) y conteo visual del número de brotes (tasa de multiplicación de

brotos) de cada unidad experimental (frasco de vidrio con un explante) a los 15, 30 y 45 días por tratamiento. Las siete variables independientes y sus concentraciones se obtuvieron a través de un estudio realizado por Zeng y otros (2013, p. 401-409), donde evaluaron los requerimientos nutricionales de la *Rosa x hybrida*. Las variables evaluadas en el presente estudio son las concentraciones de dos citoquininas (6-Benzilaminopurina y kinetina), una auxina (ácido naftalenacético), las concentraciones de nitrógeno, fósforo y potasio, y la concentración de sacarosa en un medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (Murashige, T y Skoog, F, 1962, p. 473-497)

La velocidad de crecimiento de número de brotes y la tasa de multiplicación de brotes se calculó con las siguientes formulas:

$$\text{Velocidad de crecimiento (mm.día}^{-1}\text{)} = R = \frac{W_f - W_i}{t_f - t_i} \quad (\text{Fórmula 6})$$

Dónde: W_f : Valor de la altitud en mm en el tiempo final (45 días)

W_i : Valor de la altitud en mm en el tiempo inicial (día 0 de la Fase II)

t_f : Tiempo final (45 días)

t_i : Tiempo inicial (Día 1 de la siembra)

$$\text{Tasa promedio del número de brotes} = \frac{\sum \# \text{ de brotes por trat. a los 45 días}}{\# \text{ total de repeticiones}} \quad (\text{Fórmula 7})$$

Finalmente, se evaluó que variables independientes tienen un mayor efecto positivo en las variables respuesta. Dichas variables significativas se determinaron mediante un diagrama de Pareto, el cual es una gráfica que organiza datos de forma descendente y permite asignar un orden de prioridades, centrándose en los factores que tendrán un mayor impacto en las variables respuesta, optimizando los resultados. (Aiteco consultores, 2011)

Tabla 3:

Variables utilizadas para el diseño de Plackett-Burman en la fase II.

Código	Variabes	Valor Max	Valor Min
F1	6-BAP	3 mg/L	1 mg/L
F2	KINETINA	3 mg/L	1 mg/L

F3	ANA	1 mg/L	0.1 mg/L
F4	KNO ₃	2850 mg/L	1900 mg/L
F5	NH ₄ NO ₃	2475 mg/L	1650 mg/L
F6	KH ₂ PO ₄	340 mg/L	170 mg/L
F7	Sacarosa	50 g/L	30 g /L
Control	MS basal		

Nota: Variables independientes (F1, F2, F3, F4, F5, F6 y F7) para la fase Identificación de variables significativas de ambas variedades de Rosa x híbrida, del diseño factorial Plackett-Burman con dos niveles; un valor máximo y un valor mínimo de concentración de las diferentes variables. Se realizó 6 repeticiones por tratamiento con un explante por repetición. Control: Medio Murashige y Skoog (MS) basal sin reguladores de crecimiento

Tabla 4:

Matriz del diseño experimental de Plackett-Burman

Tratamientos	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
T1	+	-	-	+	-	+	+
T2	+	+	-	-	+	-	+
T3	+	+	+	-	-	+	-
T4	-	+	+	+	-	-	+
T5	+	-	+	+	+	-	-
T6	-	+	-	+	+	+	-
T7	-	-	+	-	+	+	+
T8	-	-	-	-	-	-	-

Adaptado de Plackett, R., y Burman, J, 1946.

Nota: Tratamientos resultantes del diseño factorial Plackett-Burman donde intervienen las 7 variables independientes descritas en la tabla 3.

3.3. Fase III: Establecimiento de un protocolo específico de multiplicación de brotes.

En la tercera fase (establecimiento de un protocolo específico de multiplicación de brotes) se realizó un diseño factorial 2x2 utilizando las dos variables más significativas obtenidas en la Fase II, a través del diagrama de Pareto en el

diseño factorial de Plackett-Burman, para de esta forma optimizar los resultados. La variable respuesta evaluada fue la tasa promedio de multiplicación de brotes a los 15 días luego de la siembra. La variable respuesta se evaluó mediante conteo visual del número de brotes por unidad experimental (frasco de vidrio con un explante). Se realizó 4 tratamientos de acuerdo al diseño factorial 2x2 con tres repeticiones por cada variedad de *Rosa x hybrida* (tablas 5 y 6).

La tasa promedio de multiplicación de brotes se calculó con la siguiente formula:

$$\text{Tasa promedio del número de brotes} = \frac{\sum \# \text{ de brotes por trat. a los 45 días}}{\# \text{ total de repeticiones}} \quad (\text{Fórmula 8})$$

Tabla 5:

Variables utilizadas en el diseño factorial 2x2 para dos variedades de Rosa x hybrida

Código	Variable	Valor máx. (A2)	Valor min.(B2)
A1	6-BAP	3 mg/L	1 mg/L
B1	Sacarosa	50 g/L	30 g/L
Control		MS basal	

Nota: Las variables independientes en el diseño factorial 2x2 (A1, B1) evaluadas con dos niveles de concentración, un valor máximo y un valor mínimo cada una (A2, B2) para ambas variedades de Rosa x hybrida. Control: Medio Murashige y Skoog (MS) basal sin reguladores de crecimiento. Se realizó tres replicas por cada tratamiento con un explante por repetición en ambas variedades de Rosa x hybrida.

Tabla 6:

Matriz del diseño factorial 2x2

Tratamientos	Código	Descripción
TA	A1A2	3mg/L 6-Bap + 50 g/L sacarosa
TB	A1B2	3 mg/L 6-Bap + 30 g/L sacarosa
TC	B1A2	1 mg/L 6-Bap + 50 g/L sacarosa
TD	B1B2	1 mg/L 6-Bap + 30 g/L de sacarosa

Nota: Tratamientos resultantes del diseño factorial 2x2 donde intervienen dos variables independientes descritas en la tabla 5.

3.4. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico ANOVA en los tres diseños experimentales de cada etapa (DCA, Plackett-Burman y diseño factorial 2^2) para determinar diferencias significativas en el desarrollo de los explantes en las diferentes formulaciones de medio de cultivo y también se realizó una prueba de contraste de medias de Duncan, ambas con un nivel de significancia de 0,05 ($\alpha= 5\%$). Para el diseño de Plackett-Burman se realizó un diagrama de Pareto mediante el programa estadístico Minitab 17.

Todo el trabajo de investigación se realizó por triplicado para verificar la validez del experimento.

Se estableció la hipótesis nula (H_0) y la hipótesis alternativa (H_1) para las tres fases de este estudio, siendo la hipótesis nula (H_0): No existe diferencia significativa entre los tratamientos ($p>0.05$) y la hipótesis alternativa (H_1): Si existe diferencia significativa entre los tratamientos ($p<0.05$)

A continuación, la figura 14 muestra un diagrama de flujo sobre el proceso general para la identificación de variables significativas en la multiplicación *in vitro* de dos variedades de *Rosa x hybrida*.

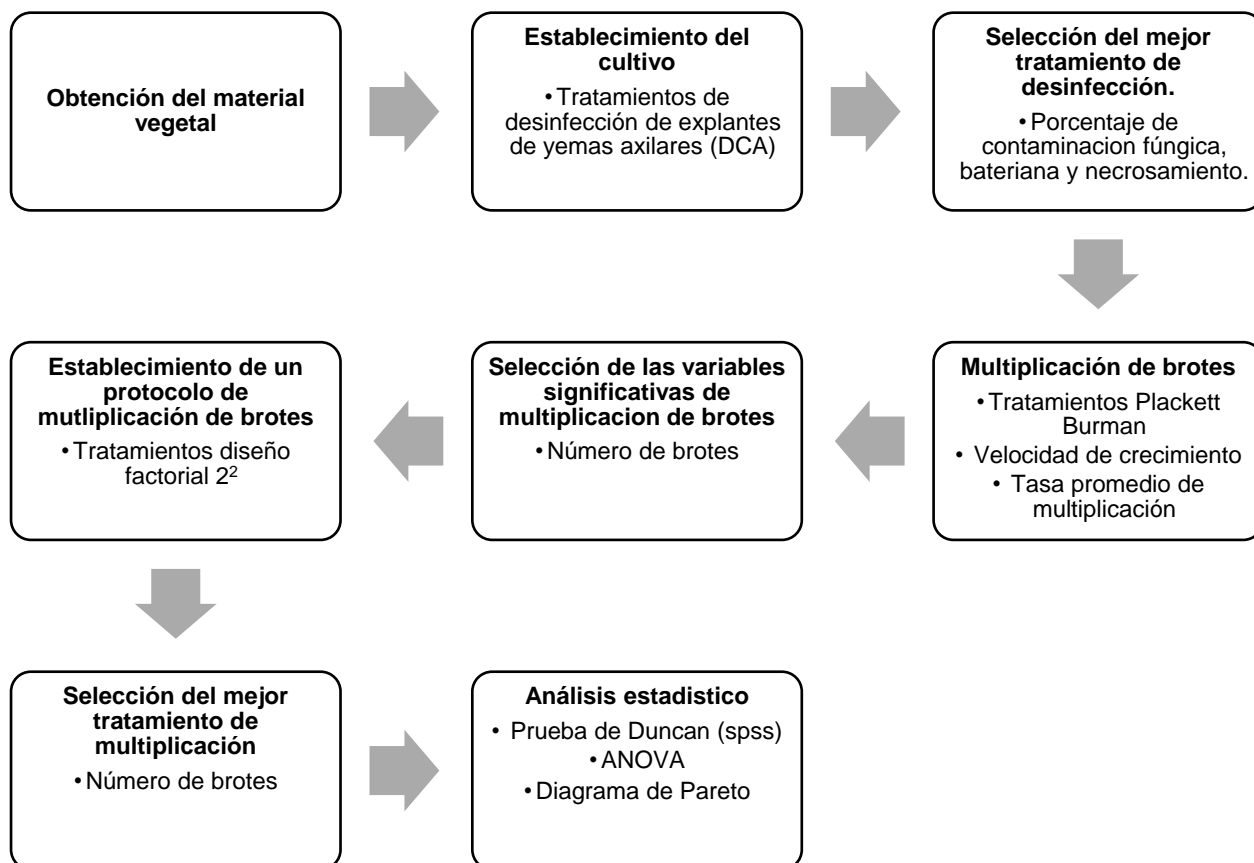


Figura 14: Diagrama de flujo para la identificación de las variables significativas en la multiplicación in vitro de dos variedades de Rosa x hybrida

Capítulo IV: Procedimientos

4.1. Población y muestra

Las plantas de dos variedades de *Rosa x hybrida* se obtuvieron de un invernadero situado en la parroquia de Nayón en la ciudad de Quito, provincia de Pichincha. La parroquia de Nayón tiene una temperatura que oscila entre los 23°C, con clima generalmente cálido-templado (Dirección de Gestión de Desarrollo Comunitario e Inclusión Social, 2012). El invernadero tiene una temperatura de 25°C y una humedad relativa de 63%, por esta razón se realizó un corto un proceso de aclimatación de las plantas una vez llevadas al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de las Américas para que

se conserven adecuadamente durante varios días. El riego manual de las plantas se realizó de 2-3 veces por semana y la poda una vez por semana.

Las plantas escogidas para el cultivo *in vitro* fueron visualmente sanas, de al menos tres meses de crecimiento y un máximo de 6 meses, con tallos fuertes, hojas de coloración verde claro y sin presencia de plagas o enfermedades.

4.2. Obtención de los explantes

Para la obtención de explantes de “híbrido de té” y “minirosa” se realizó un corte transversal de 2 cm de largo, que contengan al menos una yema axilar. Se retiró cuidadosamente las hojas y espinas del explante y se retiró los residuos de tierra con agua destilada.

4.3. Preparación de medios e incubación

Los medios utilizados para la Fase I del experimento fueron medios Murashige y Skoog basal (MS), sin suplementos hormonales. Para la Fase II se utilizaron medios MS modificados de acuerdo al diseño Plackett-Burman y para la Fase III se utilizaron medios MS basal suplementados con hormonas de acuerdo al diseño factorial 2x2. Todos los medios de cultivo se ajustaron a un pH de 5.7-5.8 con 7 g/l de Bacto agar y autoclavados a 121 °C a 1.06 kg cm⁻² durante 20 minutos.

Las condiciones de temperatura, humedad y fotoperiodo se replicaron de un trabajo de investigación realizado por Zeng y otros (2013, p.401-409). El fotoperiodo fue de 16 horas luz/8 horas oscuridad. La temperatura en la fase luminosa fue de 28°C y en la fase oscura de 23°C y la humedad relativa se mantuvo al 63%. Las condiciones físicas se mantuvieron constantes en las tres fases de este estudio.

4.4. Fase I: Desinfección

Para la desinfección superficial, se lavaron los explantes de yemas axilares en una solución de agua jabonosa durante 10 minutos con agitación; posteriormente se sumergieron en una solución de etanol al 70% durante 10 segundos; y finalmente, se sumergieron en distintas concentraciones de hipoclorito de sodio (2.5%, 5%, 10% y 15%) con Tween 80 en agitación durante 10 minutos. Posteriormente, dentro de la cámara de flujo laminar se realizaron tres lavados con agua destilada estéril durante 5, 10 y 15 minutos para la remoción de residuos del desinfectante y se procedió a la siembra de los explantes.

Para la siembra se realizó un corte transversal 0.5 a 1 cm de largo, a partir de la yema axilar, con un bisturí para eliminar el material necrosado por el proceso de desinfección, luego con una pinza estéril se colocó el explante en un tubo de ensayo con medio de cultivo Murashige y Skoog basal (Murashige, T y Skoog, F, 1962, p.473-497), en posición vertical natural. Por último, los explantes se incubaron a una temperatura de 28°C (fase luminosa) y 23°C (fase oscuridad), con un fotoperiodo de 16horas luz/8 horas oscuridad.

Los porcentajes de contaminación bacteriana, fúngica y total se evaluaron a los 7 y 15 días posteriores a la siembra y los porcentajes de necrosamiento y viabilidad se evaluaron a los 15 días después de la siembra.

Una vez determinado el protocolo de desinfección de los explantes de ambas variedades de rosa, se procedió a realizar la siembra de yemas axilares en medio MS basal con el mejor tratamiento de desinfección para el establecimiento de los explantes, para posteriormente ser usadas en la fase II.

4.5. Fase II: Identificación de variables significativas

Los explantes establecidos fueron trasplantados a los medios de cultivo de la fase II, después de 15 días. Se evaluó la velocidad de crecimiento mediante medición manual de la altitud de los explantes en un periodo de 15 ,30 y 45 días y se evaluó la tasa promedio de multiplicación de brotes mediante conteo visual del

número de brotes, a los 45 días por cada tratamiento para ambas variedades de *Rosa x hybrida* (Razavizadech, R y Ehsanpour, A, 2008, p. 768-793). Se realizó el análisis estadístico ANOVA para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos y la prueba de contraste de medias de Duncan para establecer cuál es el mejor tratamiento de multiplicación de brotes para ambas variedades de *Rosa x hybrida*. Posteriormente se realizó un diagrama de Pareto para establecer que variables del diseño experimental Plackett-Burman, son más influyentes en la multiplicación de brotes para “minirosa” e “híbrido de té”.

4.6. Fase III: Establecimiento de un protocolo específico de multiplicación de brotes.

Una vez que se determinó las variables más significativas en la multiplicación de brotes de ambas variedades mediante el diagrama de Pareto y el análisis estadístico del diseño experimental Plackett-Burman, se procedió al establecimiento de un protocolo de multiplicación de brotes específico para ambas variedades de *Rosa x hybrida*. Dentro de la cámara de flujo, se realizaron cultivos de yemas axilares de las dos variedades en estudio. Las yemas obtenidas se sembraron en los medios formulados de acuerdo al diseño factorial 2x2 de la Fase III. El número de brotes fue evaluado mediante conteo visual a los 15 días de siembra. Se realizó el análisis estadístico ANOVA y la prueba de contraste de medias de Duncan para determinar si existe diferencia significativa de los tratamientos en el número de brotes y para establecer cuál es el mejor tratamiento de multiplicación de brotes en ambas variedades de *Rosa x hybrida*. Se utilizó un explante de yema axilar por frasco de vidrio y se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento en “minirosa” y en “híbrido de té”.

4.7. Evaluación estadística de los resultados

El análisis de datos se realizó mediante dos programas estadísticos, Minitab 17 para el análisis de los diseños factoriales Plackett-Burman y la obtención de los diagramas de Pareto y el programa estadístico SPSS versión 24 para el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de contraste de medias de Duncan en los tres

diseños experimentales utilizados en este estudio (DCA, Plackett-Burman y factorial 2x2).

Capítulo V: Resultados y discusión

5.1. Fase I: Establecimiento de cultivo

5.1.1. Porcentaje de contaminación

En la fase de desinfección se realizaron cuatro tratamientos en los cuales se varió la concentración de cloro. Las barras reflejadas en las figuras 13A y 13B representan los porcentajes de contaminación bacteriana y fúngica de yemas axilares de la variedad “minirosa” a los 7 días de siembra en medio MS basal, con su respectiva desviación estándar. Los resultados reflejan que a los 7 días de evaluación, el tratamiento 1 tuvo el mayor porcentaje de contaminación, con un 23.3% de contaminación bacteriana y 56.7% de contaminación fúngica. Por otro lado el tratamiento 4 presentó el menor porcentaje de contaminación bacteriana con un 3,3% y 7% de contaminación fúngica. Los tratamientos 2 y 3 también presentaron un porcentaje bajo de contaminación, con un 13,3% de contaminación bacteriana y 16,6% de contaminación fúngica para el tratamiento 2 y 3,3% de contaminación bacteriana y 13,3% de contaminación fúngica para el Tratamiento 3.

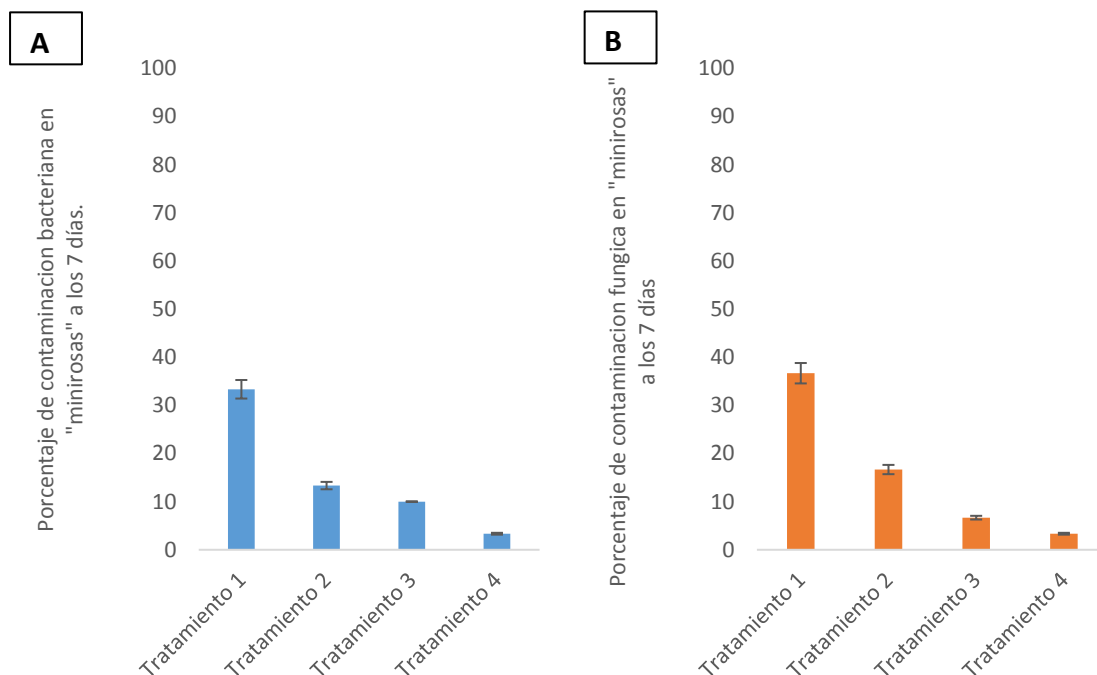


Figura 13: Contaminación bacteriana y fúngica a los 7 días de siembra en la variedad de "minirosa". (A) Contaminación bacteriana, (B) Contaminación fúngica.

- Tratamiento 1: 2.5% de hipoclorito de sodio
- Tratamiento 2: 5% de hipoclorito de sodio
- Tratamiento 3: 10% de hipoclorito de sodio
- Tratamiento 4: 15% de hipoclorito de sodio

Las barras reflejadas en la figura 14A y 14B representan los porcentajes de contaminación bacteriana y fúngica de yemas axilares de la variedad "minirosa" a los 15 días de siembra, con sus respectivas barras de error. Los resultados indican que la tendencia de los porcentajes de contaminación se mantiene. El tratamiento 1 (Figura 16A) nuevamente presentó el mayor porcentaje de contaminación con un 23.3% de contaminación bacteriana y 60% de contaminación fúngica. El tratamiento 4 presentó el menor porcentaje de contaminación con un 6.7% de contaminación bacteriana y 13.3% de contaminación fúngica. El tratamiento 2 (Figura 16B) presentó un 23,3% de contaminación bacteriana y 33,3% de contaminación fúngica y el tratamiento 3, 3.3% de contaminación bacteriana y 33.3% de contaminación fúngica.

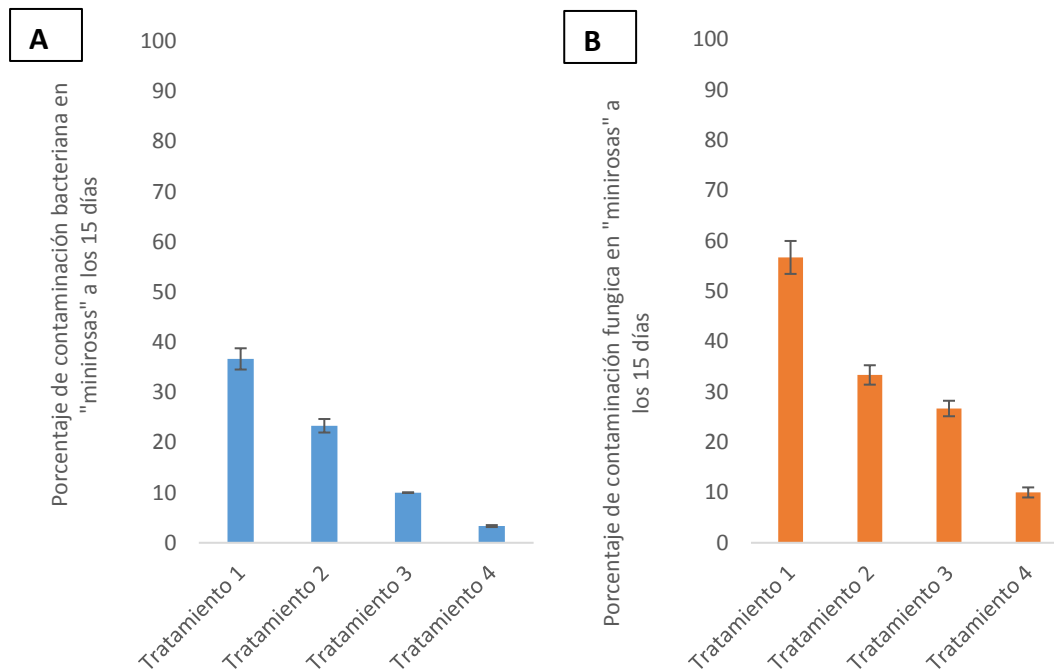


Figura 14: Porcentaje de contaminación fúngica y bacteriana a los 15 días de siembra en la variedad "minirosa" (A) Contaminación bacteriana, (B) Contaminación fúngica.

- a) Tratamiento 1: 2.5% de hipoclorito de sodio
- b) Tratamiento 2: 5% de hipoclorito de sodio
- c) Tratamiento 3: 10% de hipoclorito de sodio
- d) Tratamiento 4: 15% de hipoclorito de sodio

El análisis estadístico ANOVA y la prueba de contraste de medios de Duncan se realizó en el porcentaje de contaminación total (contaminación bacteriana + contaminación fúngica) evaluado a los 15 días por tratamiento, con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha = 5\%$). Los resultados en la Figura 15 indican una diferencia significativa en cuanto a la contaminación total entre los cuatro tratamientos en la variedad de "minirosa". El tratamiento con una mayor diferencia significativa fue el tratamiento 1, el cual presentó el valor más alto de contaminación (93.3%) en comparación con los otros tratamientos. El tratamiento 2 también presentó un nivel alto de contaminación (60%) y los tratamientos con un porcentaje bajo de contaminación total fueron el 3 y 4 con 36.6% y 13.3% respectivamente

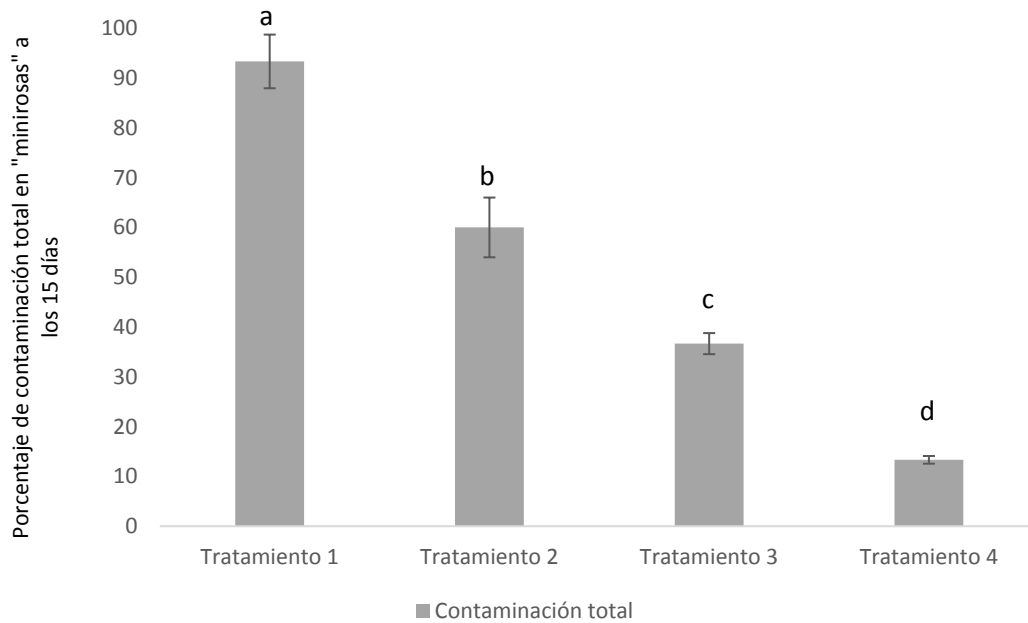


Figura 15: Evaluación de la contaminación total de los cuatro tratamientos de desinfección a los 15 días en la variedad “minirosa”.

- a) Tratamiento 1: 2.5% de hipoclorito de sodio
- b) Tratamiento 2: 5% de hipoclorito de sodio
- c) Tratamiento 3: 10% de hipoclorito de sodio
- d) Tratamiento 4: 15% de hipoclorito de sodio

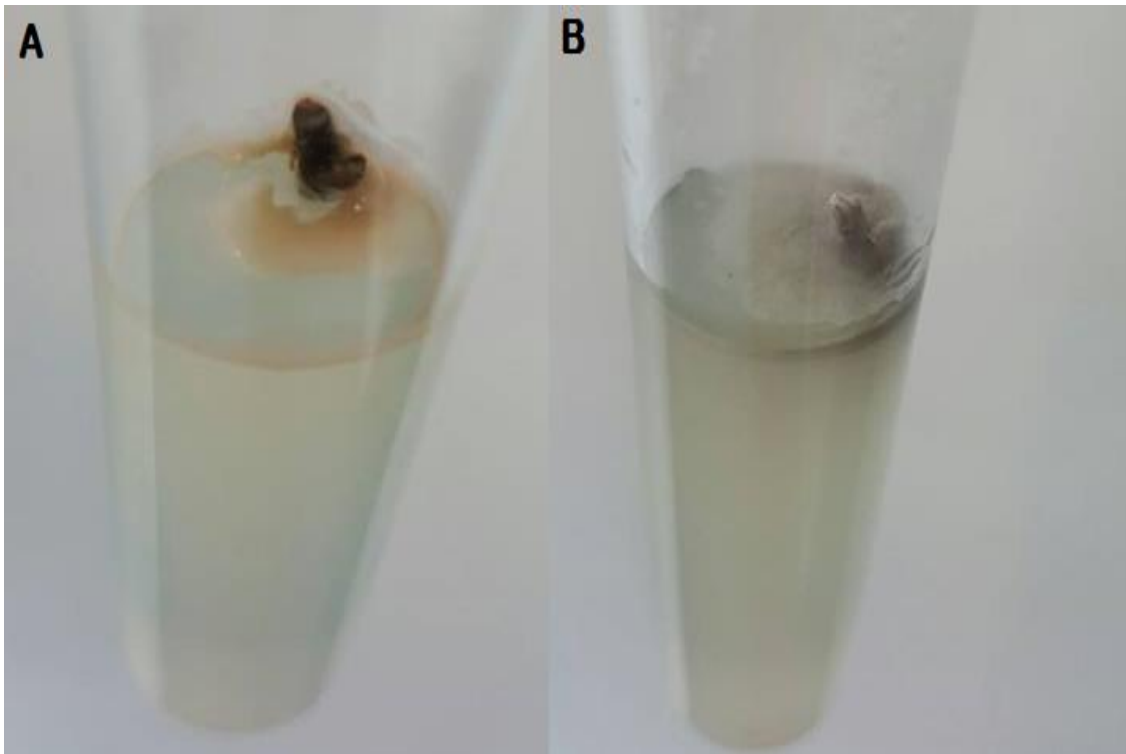


Figura 16: Explantes de “minirosa” contaminados: (A) Explante con contaminación bacteriana (Tratamiento 1), (B) Explante con contaminación fúngica (Tratamiento 2)

En cuanto al “híbrido de té”, las figuras 17A y 17B representan los porcentajes de contaminación bacteriana y fúngica de yemas axilares a los 7 días de siembra en medio MS basal, con su respectiva desviación estándar. Los resultados obtenidos fueron similares que con la variedad de “minirosa”. El tratamiento 1 presentó un nivel de contaminación mayor que todos los tratamientos con un 26.7% de contaminación bacteriana y 23.3% de contaminación fúngica, mientras que el tratamiento 4 mostró el menor porcentaje de contaminación, con una 10% de contaminación fúngica y no presentó contaminación bacteriana. Por otra parte, el tratamiento 2 presentó un 13,3% de contaminación bacteriana y 26,6% de contaminación fúngica y el tratamiento 3 mostró un 10% de contaminación bacteriana y 13.3% de contaminación fúngica.

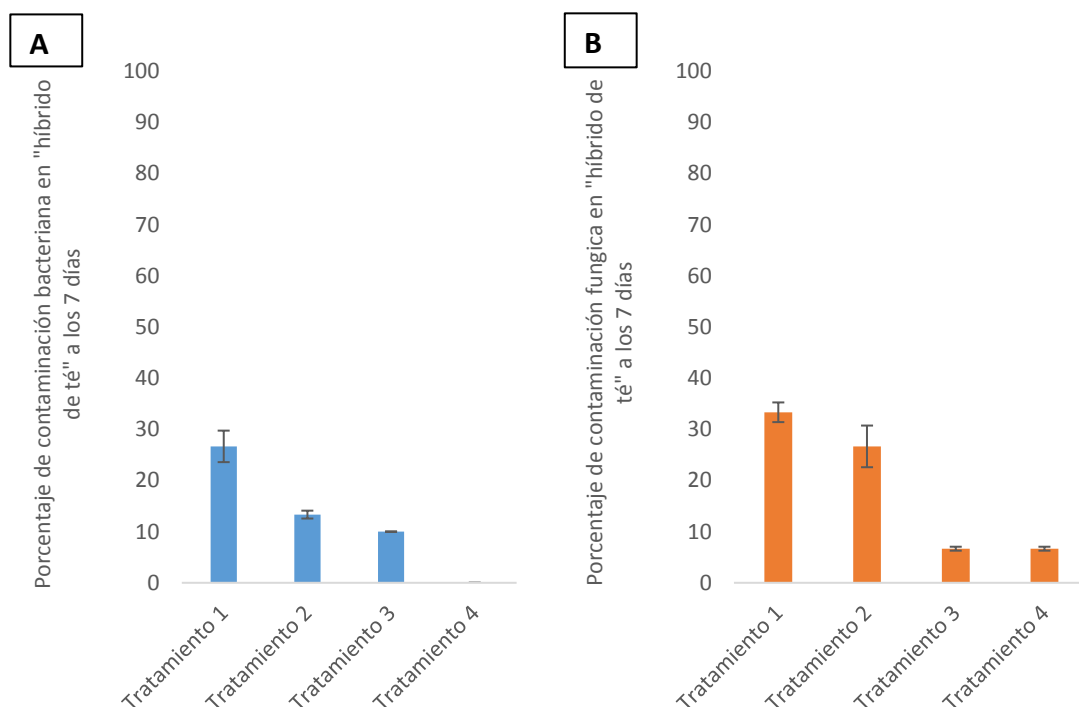


Figura 17: Contaminación bacteriana y fúngica en "híbrido de té" a los 7 días de siembra: (A) Contaminación bacteriana, (B) Contaminación fúngica

- Tratamiento 1: 2.5% de hipoclorito de sodio
- Tratamiento 2: 5% de hipoclorito de sodio
- Tratamiento 3: 10% de hipoclorito de sodio
- Tratamiento 4: 15% de hipoclorito de sodio

A los 15 días, las figuras 18A y 18B muestran los porcentajes de contaminación bacteriana y fúngica de yemas axilares, con sus respectivas barras de error. Del mismo modo, el tratamiento 1 se mantuvo con el mayor porcentaje de contaminación, con un 30% de contaminación bacteriana (figura 20A) y 30% de contaminación fúngica. El tratamiento 4 presentó tendencia similar a lo observado anteriormente, pues los valores más bajos de contaminación (0% de contaminación bacteriana y 20% de contaminación fúngica) fueron obtenidos con este tratamiento. El tratamiento 2 no aumentó el porcentaje de contaminación bacteriana (13,3%) pero presentó un porcentaje de contaminación fúngica de 40% (figura 20B). Por último, el tratamiento 3 presentó un 16,6% de contaminación bacteriana y 10% de contaminación fúngica.

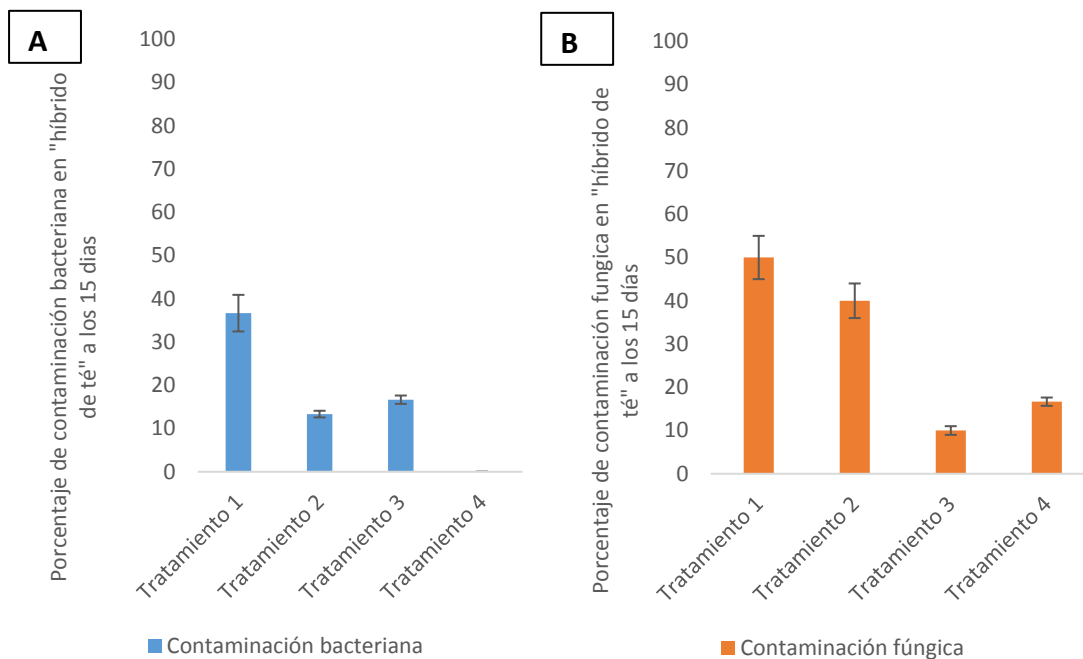


Figura 18: Contaminación bacteriana y fúngica en "híbrido de té" a los 15 días de siembra. (A) Contaminación bacteriana, (B) Contaminación fúngica

- a) Tratamiento 1: 2.5% de hipoclorito de sodio
- b) Tratamiento 2: 5% de hipoclorito de sodio
- c) Tratamiento 3: 10% de hipoclorito de sodio
- d) Tratamiento 4: 15% de hipoclorito de sodio

Se realizó un análisis estadístico ANOVA y una prueba de Duncan en los datos que se obtuvieron de la evaluación del porcentaje de contaminación total (contaminación bacteriana + contaminación fúngica) a los 15 días en la variedad de "híbrido de té", con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha = 5\%$). En la figura 19 se puede observar que el tratamiento 1 presentó la mayor diferencia significativa en cuanto a los otros tratamientos, con un porcentaje de contaminación total de 86.6%, seguido del tratamiento 2 que presentó 53.3% de contaminación total. Los tratamientos 3 y 4 presentaron los valores más bajos de contaminación con un 23.3% y 16.6% de contaminación total respectivamente. No hubo diferencia significativa en cuanto al porcentaje de contaminación entre los tratamientos 3 y 4.

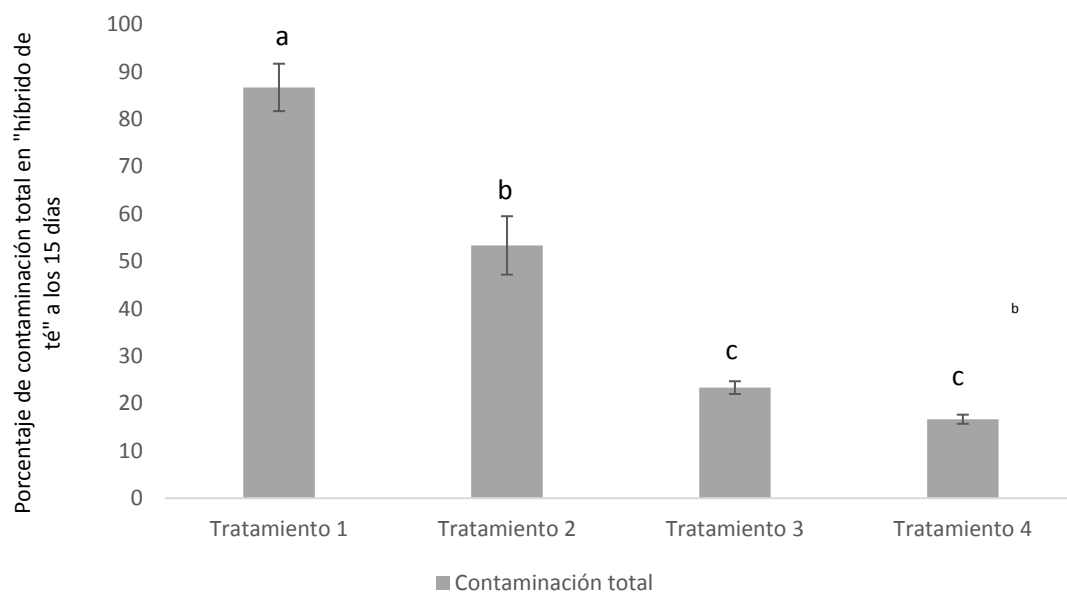


Figura 19: Evaluación de la contaminación total de los cuatro tratamientos de desinfección a los 15 días en la variedad "hibrido de té".

- a) Tratamiento 1: 2.5% de hipoclorito de sodio
- b) Tratamiento 2: 5% de hipoclorito de sodio
- c) Tratamiento 3: 10% de hipoclorito de sodio
- d) Tratamiento 4: 15% de hipoclorito de sodio

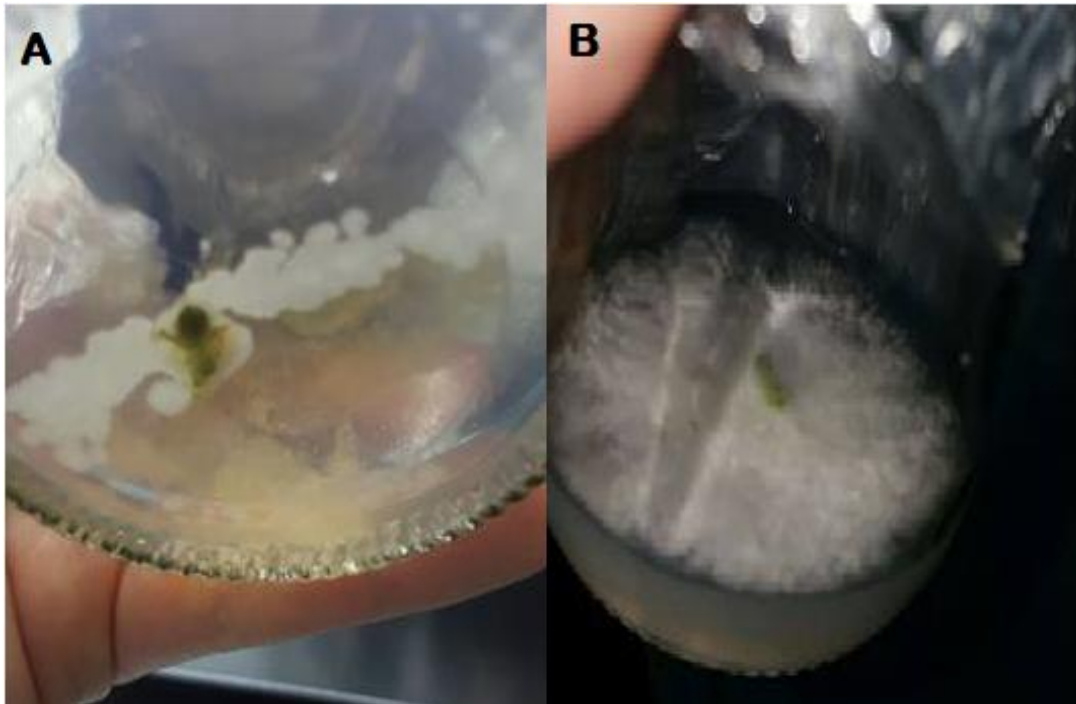


Figura 20: Explantes de “hibrido de té” contaminados: (A) Explante con contaminación bacteriana (Tratamiento 1), (B) Explante con contaminación fúngica (Tratamiento 2)

Las desviaciones estándar de los cuatro tratamientos en porcentaje de contaminación a los 7 y 15 días para ambas variedades, indican que no presentan un alto grado de variación de las repeticiones bajo las mismas condiciones, con esto se puede concluir que los tratamientos presentan reproducibilidad y repetitividad.

Los resultados del análisis de varianza y la prueba de Duncan indican que existe una diferencia significativa ($p < 0,05$) del hipoclorito de sodio a distintas concentraciones sobre los porcentajes de contaminación de ambas variedades de *Rosa x hybrida*, con lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

En la fase de desinfección de yemas axilares se obtuvieron los menores porcentajes de contaminación mientras mayor es la concentración de hipoclorito de sodio con un tiempo de inmersión de los explantes de 10 minutos. Se determinó que el tratamiento 4 (15% de NaClO) en ambas variedades presentó el menor porcentaje de contaminación total, con un 13.3% en “minirosas” y 16.6% en “hibrido de té”. Esto debido a que el hipoclorito de sodio a mayor

concentración actúa como un agente desinfectante superficial, el cual es letal para la mayoría de microorganismos, virus y bacterias vegetativas, pero es menos efectivo contra esporas y hongos en especies leñosas (Perez, J., et al, 1993, p.67-84). Por tal razón, el porcentaje de contaminación fúngica en ambas variedades de *Rosa x hybrida* resultó mayor al porcentaje de contaminación bacteriana en todos los tratamientos a los 15 días de siembra (Borges, M., et al, 2009). Por otro lado, el tratamiento 1(2.5% de NaClO) fue el que presentó mayores porcentajes de contaminación total en ambas variedades, con un 93.3% en “minirosas” y 86.7% en “hibrido de té”. Esto debido a la baja concentración del hipoclorito de sodio, la cual no fue suficiente para desinfectar los explantes. Estos resultados coinciden con lo señalado por Carranza y otros (2013, p.456-462) los cuales manifestaron que a menores concentraciones de hipoclorito de sodio en explantes de yemas axilares de plantas leñosas, mayor es la contaminación. La contaminación bacteriana y fúngica es uno de los mayores problemas que se presentan en el cultivo *in vitro* de especies vegetales con fines comerciales y de investigación, puesto que han causado grandes pérdidas de material vegetal y por ende pérdidas económicas. La contaminación bacteriana y fúngica pueden presentar dos orígenes que son: Microorganismos endógenos y superficiales o introducidos por la manipulación dentro del laboratorio. (Hernandez, Y., y Gonzalez, M, 2010)

Según Borges y otros (2009), es muy importante realizar un proceso de desinfección superficial antes de la siembra de explantes de yemas axilares en el cultivo *in vitro* de plantas leñosas. Esto debido a que este tipo de especies presentan hendiduras en su tallo leñoso, donde se acumula una mayor cantidad de microorganismos, en su mayoría fúngicos y por tal razón se necesita de un proceso de desinfección adecuado para evitar pérdidas de material vegetal por contaminación. En una tesis de grado realizado por Weldt (2008, p.35-42) mencionó los diferentes compuestos químicos que son factibles al momento de obtener cultivos asépticos de la especie *Rosa canina L* a partir de yemas axilares. Entre los más comúnmente usados son el hipoclorito de sodio (NaClO) en concentraciones entre 15% y 20% v/v, el cloruro de mercurio (HgCl₂) en concentración inferiores a 5% v/v y etanol al 70% v/v. Sin embargo en el presente

estudio se obtuvo un porcentaje de contaminación bajo con un 10% de NaClO, lo cual se manifiesta que no fue necesario químicos de alta toxicidad, ni grandes concentraciones de desinfectante para yemas axilares de rosa, en comparación con otros estudios realizados.

En otro trabajo de investigación realizado por Salehi y otros (1997, p.587-601) menciona que el hipoclorito de sodio es mejor al momento de obtener cultivos asépticos *in vitro* de la variedad "Baby Masquerade" de *Rosa x hybrida*, puesto que compararon su efecto en el tejido vegetal de esta especie con cloruro mercúrico (HgCl₂) y determinaron que el NaClO es menos tóxico que el HgCl₂. Demostraron que el HgCl₂ produce una mayor oxidación y oscurecimiento en los explantes que el NaClO y es más difícil de remover.

Por otro lado, Ibrahim y Debergh (2000, p. 45-67) mencionaron en su estudio el uso de antibióticos como la ampicilina o gentamicina como alternativa en la desinfección de los explantes de yemas axilares de *Rosa hybrida L.*, debido a que encontraron bacterias Gram negativas (*Pseudomonas*) y Gram positivas (*Bacillus*) en el medio de cultivo de esta variedad de rosa luego de la desinfección superficial, lo que indica que podrían tener un origen endófito. Sin embargo, en el presente estudio, los resultados indican que el porcentaje de contaminación fúngica fue mayor que el porcentaje de contaminación bacteriana en ambas variedades, por lo que no se presentaron signos de presencia de una bacteria endófito en las variedades estudiadas. Por tanto, no se recurrió a la utilización de antibiótico para la desinfección de los explantes, debido a que la prevalencia de hongos era más notoria que la de bacterias. Ramos (2012, p.32-47) encontró que los contaminantes más comunes y difíciles de eliminar en plantas leñosas son los hongos, debido a que son sistemáticos y tienen baja susceptibilidad a compuestos químicos desinfectantes como el hipoclorito de sodio. Sin embargo, la variedad *Rosa x hybrida* casi no presenta hongos endófitos por lo tanto no fue necesario el uso de fungicidas al momento de la desinfección. (Rutledge, D, 2008)

En la familia *Rosácea* se ha determinado que existen dos factores que pueden influir en la introducción de los explantes para el cultivo *in vitro* los cuales son, el

tamaño y la edad fisiológica del explante de yemas axilares. Entre más pequeño sea el tamaño del explante menor será el porcentaje de contaminación, debido a que se reduce la superficie de contacto; en este estudio el tamaño de las yemas axilares sembradas fueron de 0.5 a 1 cm de altura, lo cual, según Abdelnour y Escalant (1994, p.98-103), se considera una altura adecuada. De igual forma los explantes de yemas axilares jóvenes tienen una menor probabilidad de contaminación que los explantes adultos, debido a que mientras mayor sea la edad fisiológica del explante, el tejido leñoso de la yema acumula mayor cantidad de microorganismos que un explante joven (Abdelnour, A y Escalant, J, 1994, p.98-103). En este estudio se utilizaron yemas axilares jóvenes, provenientes de plantas progenitoras con un máximo de seis meses de crecimiento, por lo probablemente se redujo los porcentajes de contaminación en ambas variedades de *Rosa x hybrida*.

5.1.2. Porcentaje de necrosamiento

El porcentaje de necrosamiento se evaluó 15 días después de la siembra y se realizó el análisis estadístico ANOVA y prueba de Duncan, con un nivel de significancia del 0.05 ($\alpha= 5\%$). La figura 21A indica el porcentaje de necrosamiento para la variedad “minirosa” con su respectiva desviación estándar. Los resultados indican que no hubo necrosis en el tratamiento 1, y hubo un 80% de necrosis en el tratamiento 4. El tratamiento 4 presentó diferencia significativa en comparación con los otros tratamientos, mientras que los tratamientos 2 y 3 no fueron significativamente diferentes (Figura 22A).

Por otro lado, la figura 21B indica porcentajes de necrosamiento de la variedad “híbrido de té”, con sus respectivas barras de error. Los resultados determinaron que el tratamiento 4, mostró un porcentaje de necrosis de 46.6% presentando la mayor diferencia significativa, mientras que entre los tratamientos 2(13.3%) y 3(13.3%) no hubo variación en los porcentajes de necrosamiento. El tratamiento 1 no presentó necrosis en los explantes (Figura 22B).

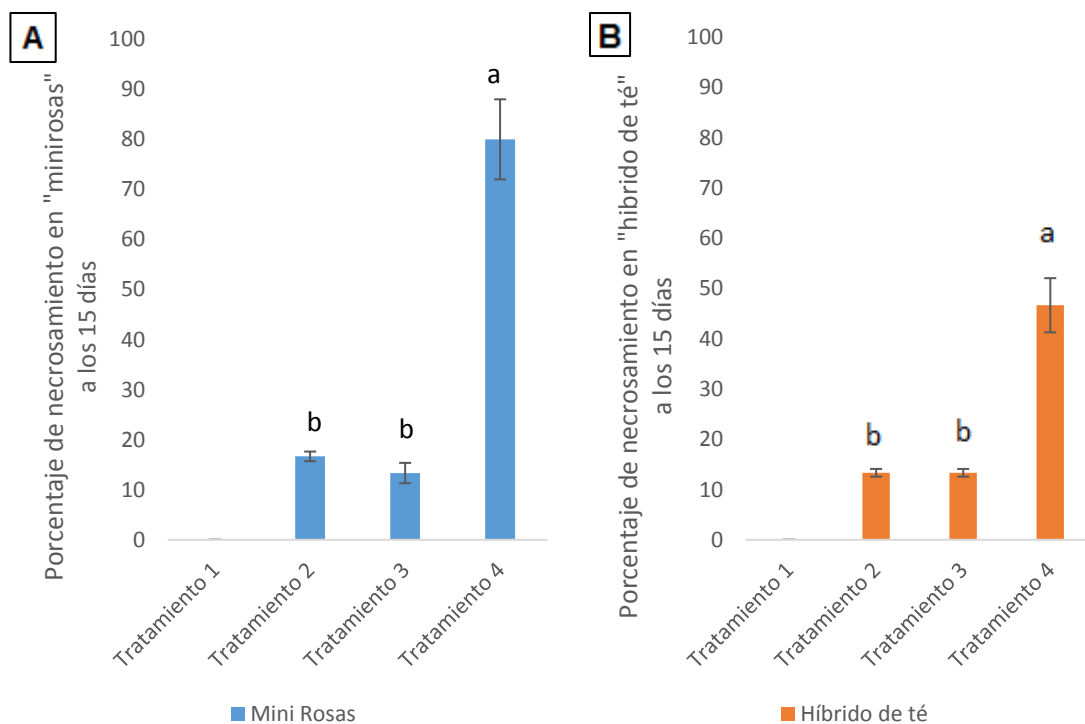


Figura 21: Porcentaje de necrosamiento a los 15 días de siembra: (A) Porcentaje de necrosamiento en "minirosas" (tratamiento 4), (B) Porcentaje de necrosamiento en "híbrido de té" (tratamiento 4)

- a) Tratamiento 1: 2.5% de hipoclorito de sodio
- b) Tratamiento 2: 5% de hipoclorito de sodio
- c) Tratamiento 3: 10% de hipoclorito de sodio
- d) Tratamiento 4: 15% de hipoclorito de sodio

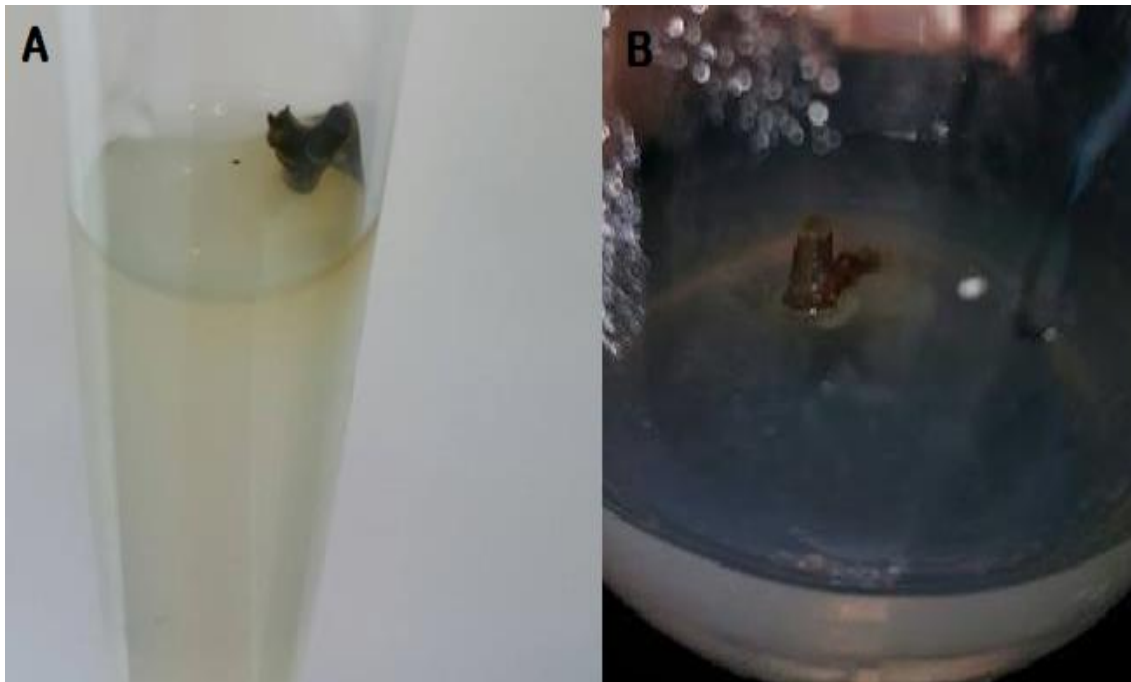


Figura 22: Explantes necrosados: (A) Explante necrosado de “minirosa”, (B) Explante necrosado de “híbrido de té”

Como se puede observar en las figuras 21A y 21B no hubo necrosis en el tratamiento 1 en ambas variedades a los 15 días de siembra, debido principalmente a que la mayoría de los explantes se contaminaron. Por otro lado el tratamiento 4 presentó los porcentajes más altos de necrosamiento en ambas variedades, debido probablemente a las altas concentraciones de NaClO. El tratamiento 4 mostró una alta diferencia significativa, según la prueba de Duncan. Al igual que con la variable “contaminación” la desviación estándar de todos los tratamientos, indica que no existe un alto grado de variación de los resultados en cuanto a las repeticiones bajo las mismas condiciones, por lo que los tratamientos son reproducibles y repetibles. También el análisis estadístico ANOVA determinó que si existen diferencia significativa ($p < 0.005$) en la variable “porcentaje de necrosamiento”, con lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa.

Se puede observar en las figuras 21A y 21B, que a medida que aumenta la concentración de hipoclorito de sodio se incrementa el porcentaje de necrosis o muerte del explante en ambas variedades. En la variedad de “minirosa” el tratamiento 4 (15% NaClO) presentó un 80% de necrosis y en la variedad “híbrido

de té” presentó un 46.7% de necrosis en los explantes. Esto probablemente se debió, a que el hipoclorito de sodio tiene un efecto fitotóxico sobre los tejidos de las yemas axilares, el cual se hace más fuerte a partir de una concentración de 10%.

Azofeifa (2009, p.153-175) indica que el establecimiento del cultivo en especies leñosas, como la rosa, es limitado en gran parte por el oscurecimiento letal en los explantes y en el medio de cultivo. Este oscurecimiento es producido por el estrés oxidativo que se produce en las células del tejido vegetativo, debido al aumento de los radicales libres, los cuales generan un desbalance entre los mecanismos antioxidantes de la planta. Las moléculas oxidativas como el OH^- , se liberan debido a la acción tóxica del hipoclorito de sodio en los tejidos vegetales, provocando la destrucción de ácidos nucleicos, lípidos, polisacáridos y proteínas lo que ocasiona el colapso celular provocando la muerte del explante (Azofeifa, A, 2009, p.153-175).

Por otro lado, la mayoría de explantes de especies leñosas, pierden su color verde y empiezan a oscurecerse inmediatamente después de la escisión (Alev y Orhan, 2016, p. 56-75). Esto genera la producción de compuestos fenólicos, que son metabolitos secundarios encargados de modular la respuesta de la planta a diferentes tipos de estrés. Los compuestos fenólicos inhiben el crecimiento del explante en el medio de cultivo porque oxidan las proteínas necesarias para su desarrollo. Por lo tanto, los procesos de corte, desinfección y siembra que se generaron sobre los explantes de yemas axilares posiblemente generaron la liberación de radicales libres que provocan el necrosamiento del explante. (Azofeifa, A, 2009, p.153-175).

Afanor (2005, pp. 340-356) realizó una investigación de cultivo *in vitro* de cinco variedades de clavel (*Dianthus caryophyllus*) a partir de meristemas, el cual en la fase de desinfección utilizó hipoclorito de sodio a concentraciones de 40 y 45% v/v logrando eliminar casi en su totalidad los microorganismos contaminantes pero estas concentraciones de NaClO generaron daño al tejido vegetativo del explante ocasionando su muerte. También probaron concentraciones inferiores del desinfectante (15 y 20% v/v) logrando menos muertes por necrosis y un

óptimo porcentaje de contaminación. Estos resultados coinciden con los obtenidos en la rosa, puesto que a medida que la concentración de hipoclorito de sodio incrementa, el porcentaje de contaminación disminuye y el porcentaje de necrosamiento aumenta. Sin embargo, en el presente estudio se obtuvo una ventaja que fue la obtención de un menor porcentaje de contaminación y necrosamiento con un bajo porcentaje de NaClO (10%), lo cual se genera un ahorro de este compuesto químico y se disminuye la toxicidad en los tejidos vegetales, en comparación con otros estudios realizados con explantes de yemas axilares de plantas ornamentales.

5.1.3. Porcentaje de viabilidad

El porcentaje de viabilidad corresponde a los explantes supervivientes no necrosados ni contaminados. Se realizó el análisis estadístico ANOVA y prueba de Duncan del porcentaje de viabilidad de los cuatro tratamientos, con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha = 5\%$). Las barras de la figura 23A indican los porcentajes de viabilidad que presentan los cuatro tratamientos en “minirosas”, cada una con su respectiva desviación estándar. Los resultados determinaron que el tratamiento 1 y 4 tienen el menor porcentaje de viabilidad con un 6.66% cada uno. Mientras que el mayor porcentaje de viabilidad (50%) presentó el tratamiento 3 (Figura 24A)

En “híbrido de té” los resultados fueron similares. La figura 23B indica que el tratamiento 2 presentó el menor porcentaje de viabilidad con un 13.3%, mientras que el tratamiento 3, al igual que con “minirosas” presentó el mayor porcentaje de viabilidad con un 63.3%. El tratamiento 3 mostró el nivel más alto de significancia en ambas variedades de *Rosa x hybrida*, en cuanto a la variable “porcentaje de viabilidad” (Figura 24B)

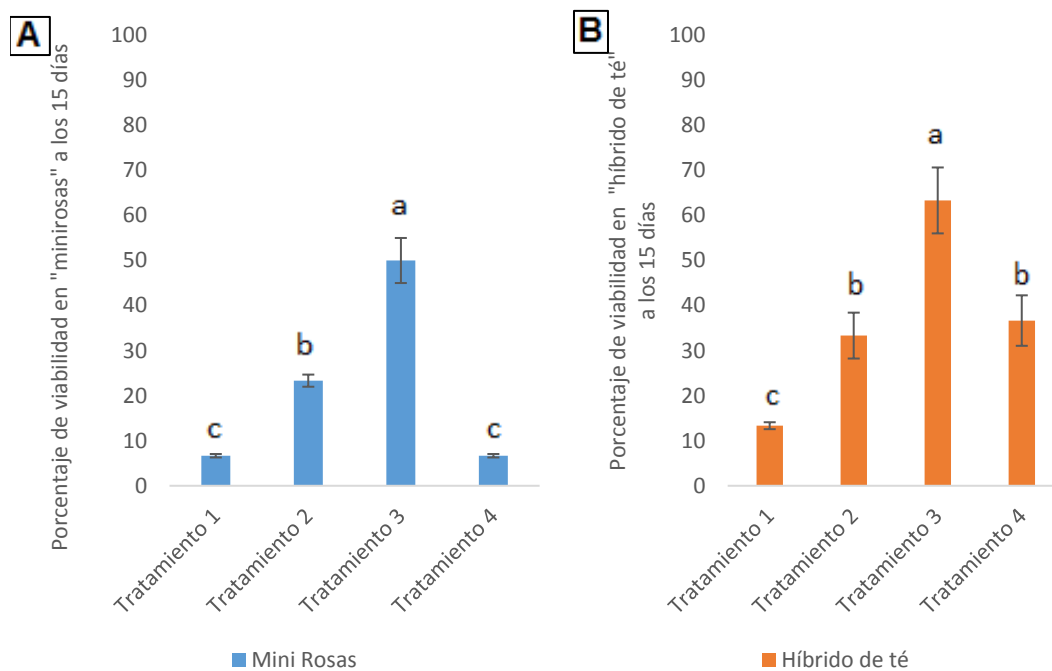


Figura 23: Porcentaje de viabilidad por tratamiento de ambas variedades de Rosa x híbrida los 15 días de siembra en medio MS basal. (A) Porcentaje de viabilidad en "minirosas", (B) Porcentaje de viabilidad en "híbrido de té"

- a) Tratamiento 1: 2.5% de hipoclorito de sodio
- b) Tratamiento 2: 5% de hipoclorito de sodio
- c) Tratamiento 3: 10% de hipoclorito de sodio
- d) Tratamiento 4: 15% de hipoclorito de sodio



Figura 24: Explantes supervivientes: (A) Explante superviviente de “minirosa”, (B) Explante superviviente de “híbrido de té”

La desviación estándar de cada uno de los tratamientos indica que no existe un alto grado de variación de los resultados en las tres repeticiones bajo las mismas condiciones, por lo tanto los tratamientos tienen reproducibilidad y repetitividad.

El análisis estadístico ANOVA y prueba de contraste de medias de Duncan señalan al tratamiento 3 como el más eficiente en cuanto a la variable “porcentaje de viabilidad” en ambas variedades de rosa. De igual forma se determinó que si existe diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$) con lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa. Por tanto, el tratamiento 3 es el tratamiento de desinfección más eficiente para la fase de establecimiento de cultivo en ambas variedades, con 50% de explantes supervivientes en “minirosas” y 63.3% en “híbrido de té”. Esto se debe a que los explantes, al estar en una concentración menor de hipoclorito de sodio, el efecto del desinfectante fue óptimo frente a la contaminación microbiana y fúngica, y que además no produjo un alto porcentaje de necrosis en los tejidos de los explantes. Sin embargo en un estudio realizado por Sisco (2011) obtuvo un mayor porcentaje de viabilidad (90%) en comparación con este estudio. Sisco (2011) estableció explantes de yemas axilares de rosa con una concentración de

hipoclorito de sodio de 15% usando una solución de antibiótico (ampicilina) por inmersión al momento de la desinfección superficial, logrando eliminar en su totalidad la contaminación bacteriana. Lo que sugiere que se puede obtener un mayor porcentaje de explantes viables al usar soluciones de antibiótico o fungicidas en la desinfección, debido a que los microorganismos bacterianos y fúngicos serían eliminados casi en su totalidad.

Existen algunos factores que pueden influir en la viabilidad de los explantes de *Rosa x hybrida*, estos son el estado fisiológico de la planta madre, contaminantes endógenos y susceptibilidad del tejido vegetal a compuestos desinfectantes (Dohare, S., et al, 1991, pp. 105-124).

Ramos (2012, pp. 105-124) menciona que las plantas leñosas cultivadas en invernaderos presentan menores contaminantes microbianos que las plantas leñosas cultivadas en campo. De igual forma, las plantas que fueron sometidas a pesticidas o fertilizantes químicos también tienden a estresarse y esto influye en su estado fisiológico. En este estudio, las plantas madres fueron obtenidas de un invernadero y fueron tratadas con pesticidas de baja toxicidad. Esto pudo influir en el estado fisiológico de la planta, ocasionándole estrés y por ende pérdidas de explantes viables al momento del cultivo *in vitro*. Así mismo, la susceptibilidad de ciertos tejidos vegetales al hipoclorito de sodio también influye en el porcentaje de viabilidad de la planta. Los tejidos más jóvenes son más delicados al efecto del hipoclorito de sodio, lo cual sugiere que podría haber una mayor susceptibilidad de las yemas axilares de *Rosa x hybrida* a la presencia del hipoclorito de sodio causando un mayor porcentaje de necrosis y disminuyendo los explantes viables. (Carranza, M., et al, 2013, pp. 456-462)

Sin embargo, con el tratamiento 3 se logró encontrar el balance entre la eficiencia de la desinfección y la supervivencia del explante en ambas variedades. En este tratamiento la concentración de hipoclorito de sodio fue el adecuado para eliminar los contaminantes microbianos y que no se produzca daños al tejido vegetal.

5.2. Fase II: Multiplicación de brotes e identificación de variables significativas con un diseño experimental Plackett-Burman

5.2.1. Velocidad de crecimiento

En la fase de multiplicación de brotes se realizaron 8 tratamientos con 7 variables diferentes, basados en el diseño factorial Plackett-Burman (tablas 2 y 3 presentadas en el capítulo 3: Diseño experimental). Las barras reflejadas en la figura 25 representan el valor promedio de la altitud de los explantes por tratamiento a los 15, 30 y 45 días después de la siembra en la variedad de “minirosa”. Los resultados indican que a los 15 días, el tratamiento T1 presentó una mayor altitud (23 mm) seguido del tratamiento T2 (16,3 mm) y el tratamiento T5 (15 mm). Los tratamientos T4 (10.3 mm), T3 (9.3 mm) y T7 (7 mm) se mantuvieron como los menos eficientes, mientras que el tratamiento T8 presentó la menor altitud con un promedio de 6 mm por tratamiento. A los 30 días, se mantuvo la tendencia de los resultados. El tratamiento T1 tuvo una mayor altitud con un promedio de 36 mm por tratamiento, seguido de los tratamientos T2, con un promedio de 23.7 mm y el T5 con 22 mm por tratamiento. Los tratamientos menos eficientes fueron el T7 y T8 con 11.7 mm y 10 mm por tratamiento respectivamente. Por último a los 45 días de siembra, el tratamiento T1 se mantuvo con la mayor altitud (56.7 mm), seguido de los tratamientos T2 y T5 con un 47.3 mm y 37.7 mm por tratamiento respectivamente, mientras que los tratamientos menos eficientes fueron el T7 (18.3 mm) y T8 (17 mm). Por lo tanto el tratamiento T1 presentó una mayor altitud a los 15, 30 y 45 días, mientras que el tratamiento T8 presentó la menor altitud por tratamiento.

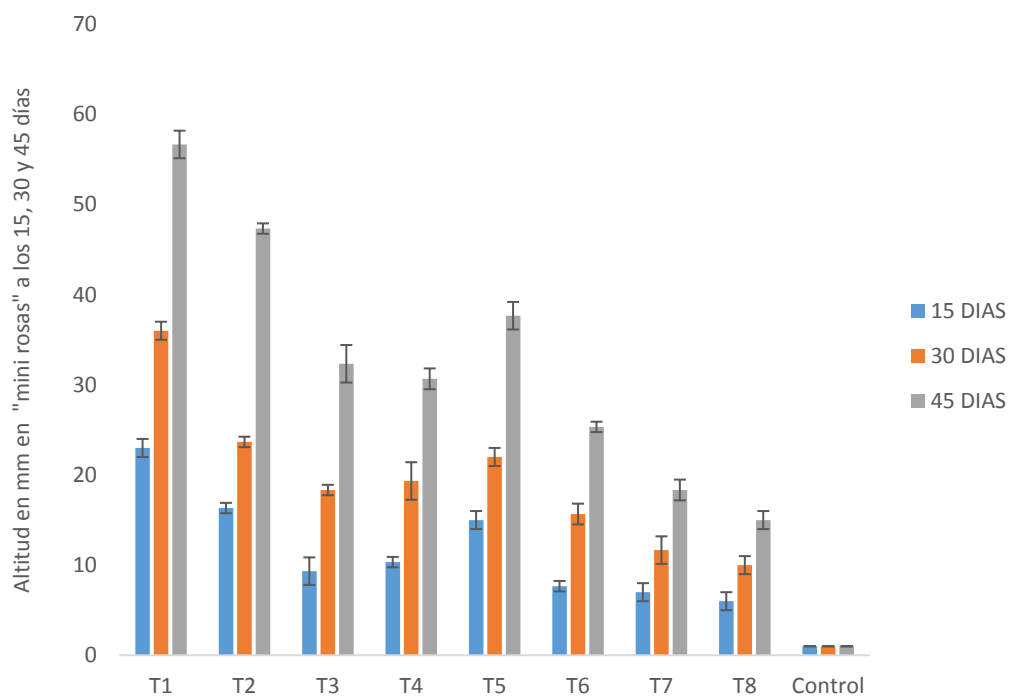


Figura 25: Altitud (mm) en “mini rosas” a los 15, 30 y 45 días después de la siembra. Control: Medio Murashige y Skoog (MS) basal. T1-T8: Tratamientos elaborados de acuerdo a la matriz del diseño experimental de Plackett-Burman.

La figura 26 refleja la velocidad de crecimiento (mm.día^{-1}) de los 8 tratamientos en la variedad de “minirosa”. Se observa una tendencia exponencial de todos los tratamientos. Sin embargo, el tratamiento con un mayor crecimiento fue el tratamiento T1, obteniendo una velocidad de crecimiento de 1.6 mm.día^{-1} , mientras que el tratamiento T8 tuvo un menor crecimiento, obteniendo una velocidad de crecimiento de 0.1 mm.día^{-1} .

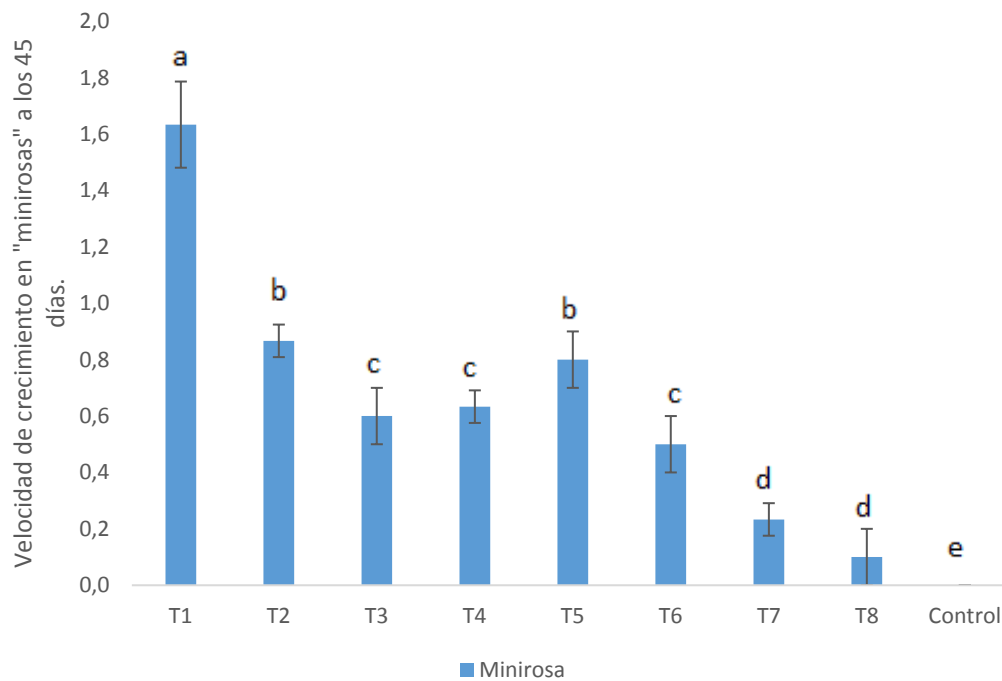


Figura 26: Velocidad de crecimiento (mm.día⁻¹) de cada uno de los 8 tratamientos del diseño experimental Plackett-Burman en “minirosa”

En cuanto a la variedad “híbrido de té” se muestra en la figura 27 que a los 15 días el tratamiento T1 presentó una mayor altitud (20.3 mm), seguido del tratamiento T4 (13.7 mm) y T2 (13.3 mm). Los tratamientos T7 (7.3 mm) y T8 (7 mm) presentaron la menor altitud. A los 30 días, se mantuvo la tendencia de los resultados. El tratamiento T1 tuvo una mayor altitud con un promedio de 32.7 mm por tratamiento, seguido de los tratamientos T2 y T4 con un promedio de 26 mm y 21.7 mm respectivamente, mientras que los tratamientos T7 (11.3 mm) y T8 (10.7 mm) presentaron la menor altitud. Por último a los 45 días de siembra, la tendencia en la velocidad de crecimiento se mantuvo. El tratamiento T1 presentó la mayor altitud con un promedio de 49.7 mm por tratamiento, seguido de los tratamientos T2 y T4 con una altitud por tratamiento de 40 mm y 32.3 mm respectivamente, mientras que los tratamientos T7 (15.3 mm) y T8 (15.3 mm) presentaron la menor altitud. Por lo tanto el tratamiento T1 presentó una mayor altitud por tratamiento a los 15, 30 y 45 días, y el tratamiento T8 presentó la menor altitud por tratamiento a los 15, 30 y 45 días.

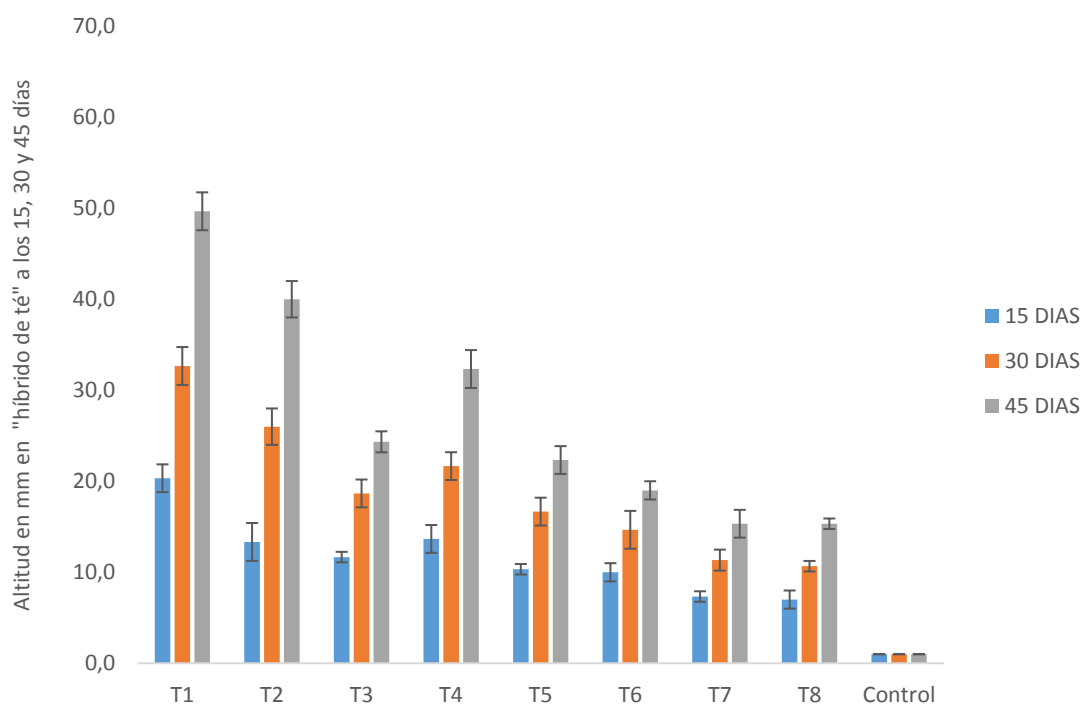


Figura 27: Altitud (mm) en “híbrido de té” a los 15, 30 y 45 días después de la siembra. Control: Explantos sembrados en medio Murashige y Skoog basal. T1-T8: Tratamientos elaborados de acuerdo a la matriz del diseño experimental de Plackett-Burman.

La velocidad de crecimiento ($\text{mm}\cdot\text{día}^{-1}$) de los 8 tratamientos de “híbrido de té” se refleja en la figura 28. Los resultados indican que todos los tratamientos tienen un crecimiento exponencial entre los 15 y 45 días, sin embargo al igual que con la variedad de “minirosa”, el tratamiento T1 presentó la mayor velocidad de crecimiento con $1.2 \text{ mm}\cdot\text{día}^{-1}$, mientras que el tratamiento T8 presentó la menor velocidad de crecimiento, con $0.1 \text{ mm}\cdot\text{día}^{-1}$.

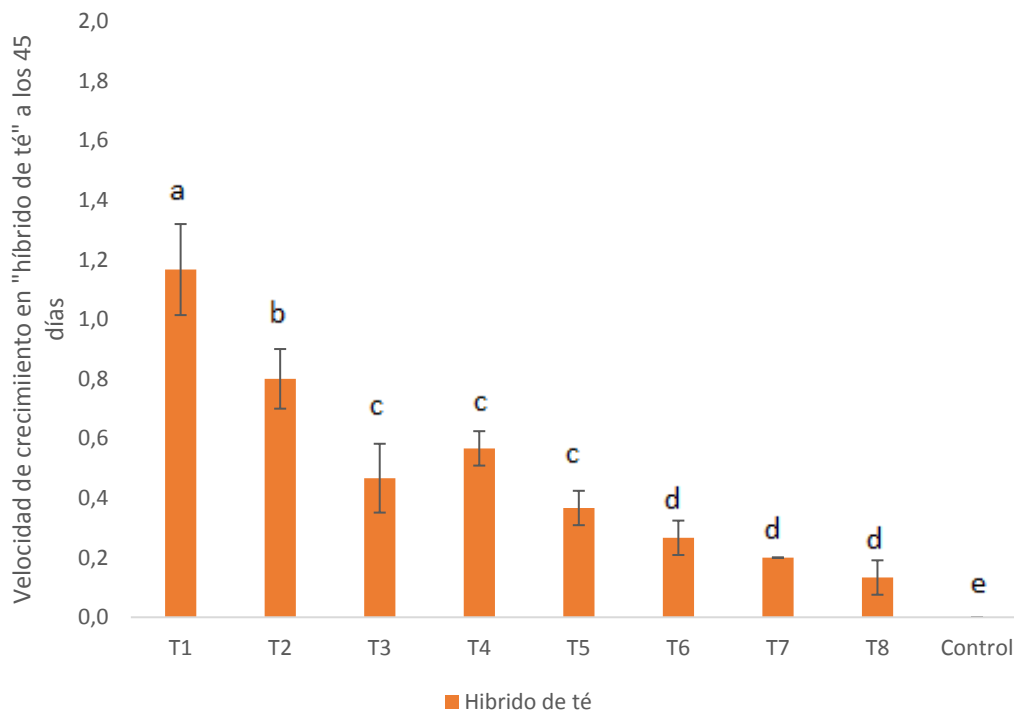


Figura 28: Velocidad de crecimiento (mm.día^{-1}) de cada uno de los 8 tratamientos del diseño experimental Plackett-Burman en “híbrido de té”

Las desviaciones estándar de las figuras 27, 28, 29 y 30 indican un bajo grado de variación entre las repeticiones de los tratamientos a las mismas condiciones. Por cual se determina que los resultados son reproducibles y repetibles.

Los resultados de las figuras 26 y 28 determinan un crecimiento exponencial de todos los tratamientos desde los 15 días hasta los 45 días para ambas variedades de rosa. En la variedad “minirosa” el tratamiento que presentó una mayor velocidad de crecimiento en altitud en función del tiempo (días) fue el tratamiento T1, presentando un crecimiento de 1.6 mm.día^{-1} , seguido del tratamiento T2 el cual desarrolló 0.9 mm.día^{-1} . Por otro lado, el tratamiento con la menor velocidad de crecimiento es el T8 presentando un crecimiento de 0.1 mm.día^{-1} . Por lo tanto el tratamiento T1 tiene una mayor velocidad de crecimiento en altitud por día en comparación con los otros tratamientos en la variedad “minirosa”.

En cuanto a la variedad “híbrido de té” los resultados fueron similares a los de “minirosa”. El tratamiento T1 presentó la mayor velocidad de crecimiento de

todos los tratamientos con un promedio de 1.2 mm.día⁻¹. Por otra parte, los tratamientos con una menor velocidad en cuanto a todos los tratamientos fueron los tratamientos T7 y T8 que obtuvieron una velocidad de crecimiento de 0.2 y 0.1 mm.día⁻¹ respectivamente.

La cinética del crecimiento vegetal, es similar a la cinética del crecimiento poblacional. Inicia con una etapa de crecimiento exponencial, en donde la velocidad de crecimiento (mm.día⁻¹) al comenzar es lenta y progresiva, esto debido al bajo número de células con la capacidad de dividirse. Posteriormente, el número de dichas células va aumentando de forma exponencial lo que ocasiona un aumento de tamaño y peso. En esta etapa la división celular predomina. La segunda fase es la lineal y existe un aumento del crecimiento de brotes proporcional a los periodos de tiempo y la tercera fase es la senescencia en donde el crecimiento comienza a desacelerar, perdiendo efectividad hasta cesar completamente. (Fernandez, G y Johnston, M, 1986). En un estudio realizado por Montañó y otros (2009, pp.567-581) evaluaron la cinética de crecimiento *in vitro* de portainjerto de vid el cual determinó que la concentración de azúcar en el medio de cultivo, influyó en la velocidad de crecimiento. Esto debido a que hubo un aumento del potencial osmótico. En el presente estudio, el tratamiento T1 está compuesto por una alta concentración de sacarosa en el medio (50 g/L) y junto con una alta concentración de la citoquinina 6-BAP (3 mg/L) pudieron influir en la velocidad de crecimiento de ambas variedades de *Rosa x hybrida*.

Existen algunos factores externos e internos que afectan a la velocidad de crecimiento vegetal. Los factores externos son la luz y temperatura. Debido a que el crecimiento celular depende de la energía liberada al momento de la respiración y del contenido de clorofila. La mala regulación de dicho factores externos pueden causar un aumento o retardo en la velocidad de crecimiento (Ferrer, M, 2001). Pero tomando en cuenta que la temperatura y la luz en este estudio se mantuvieron constantes en todos los tratamientos, no hubo influencia de los factores externos en el crecimiento de los explantes de ambas variedades de *Rosa x hybrida*.

Los factores internos como las sustancias químicas del medio de cultivo también tienen influencia en la velocidad de crecimiento de los explantes. Sustancias como las auxinas (ANA) y citoquininas (BAP y kinetina) tienen un papel muy importante en el crecimiento de los explantes, acelerando o inhibiendo el crecimiento vegetal. Por tanto, la concentración de auxinas y en especial la de citoquininas pudieron tener un efecto directo en la velocidad de crecimiento de los explantes. (Barrera, J., et al, 2007, pp. 324-345). El tratamiento T1 (1.6 mm.día^{-1}) probablemente tuvo la mayor velocidad de crecimiento por su alta concentración de 6-BAP (3mg/L) y baja concentración de Kinetina (1mg/L) en combinación con una baja concentración de ANA (0.1 mg/L).

5.2.2. Tasa promedio del número de brotes por tratamiento

Para la evaluación de la tasa promedio del número de brotes por tratamiento a los 45 días en “minirosas”, se realizó un test de medias de Duncan y un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha = 5\%$). La figura 29 indica que el mayor número de brotes en “minirosas” corresponden al tratamiento T1, el cual difiere significativamente del resto de los tratamientos evaluados ($p < 0.05$), presentando un promedio de 46.7 brotes por tratamiento. El segundo mejor tratamiento de multiplicación de brotes que mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) es el tratamiento T2 con 37.3 brotes por tratamiento. El tratamiento que presentó los valores más bajos de multiplicación de brotes es el tratamiento T8 con un promedio de 5 brotes por tratamiento (Figura 31)

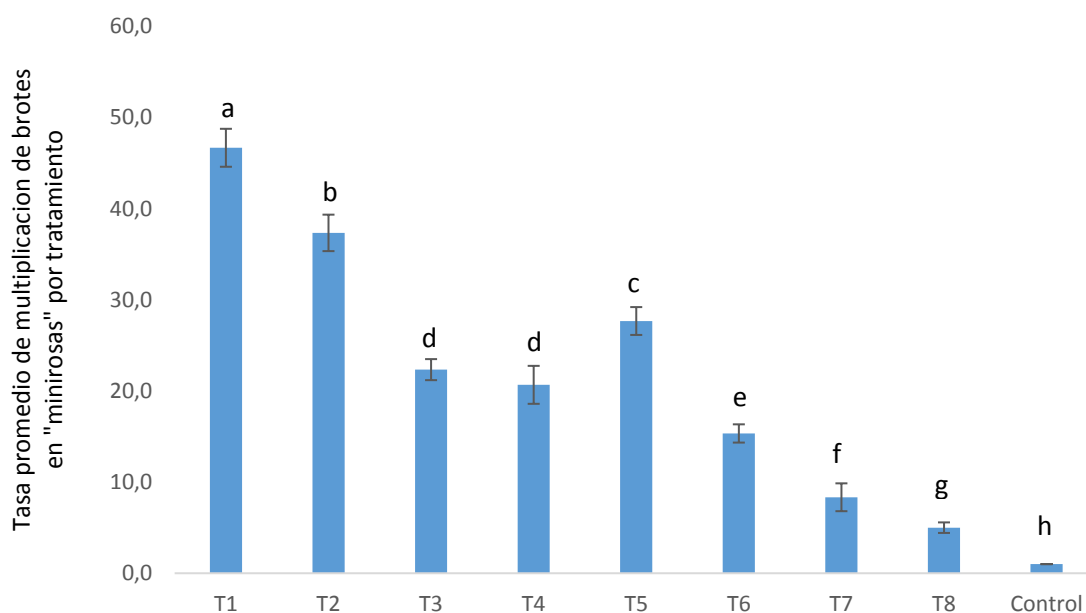


Figura 29: Número de brotes en “minirosas” en cada uno de los tratamientos del diseño factorial Plackett-Burman. Control: Medio Murashige y Skoog (MS) basal. T1-T8: Tratamientos elaborados de acuerdo a la matriz del diseño experimental de Plackett-Burman.

En cuanto a la variedad “híbrido de té” se realizó un test de medias de Duncan y un análisis de varianza (ANOVA) para determinar la significancia de los tratamientos con un valor alfa de 0,05 y de esta forma seleccionar el mejor tratamiento de multiplicación de brotes. La figura 30 muestra al igual que con la variedad de “minirosa”, el tratamiento T1 tiene una mayor tasa promedio de número de brotes, puesto que presentó una diferencia significativa en cuanto a los otros tratamientos, con un promedio de 39.7 brotes por tratamiento. El segundo mejor tratamiento de multiplicación de brotes es el tratamiento T2 con 30 brotes por tratamiento y el tratamiento con los valores más bajos de multiplicación de brotes es el tratamiento T8 con un promedio de 5.3 brotes por tratamiento (Figura 32).

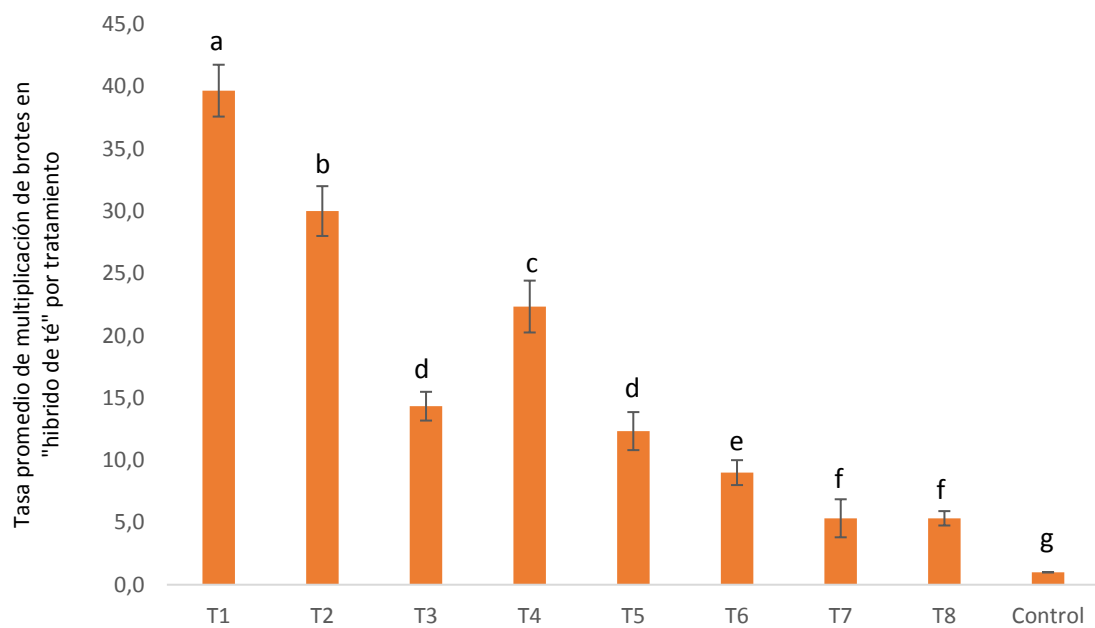


Figura 30: Número de brotes en “híbrido de té” en cada uno de los tratamientos del diseño factorial Plackett-Burman. Control: Medio Murashige y Skoog (MS) basal. T1-T8: Tratamientos elaborados de acuerdo a la matriz del diseño experimental de Plackett-Burman.

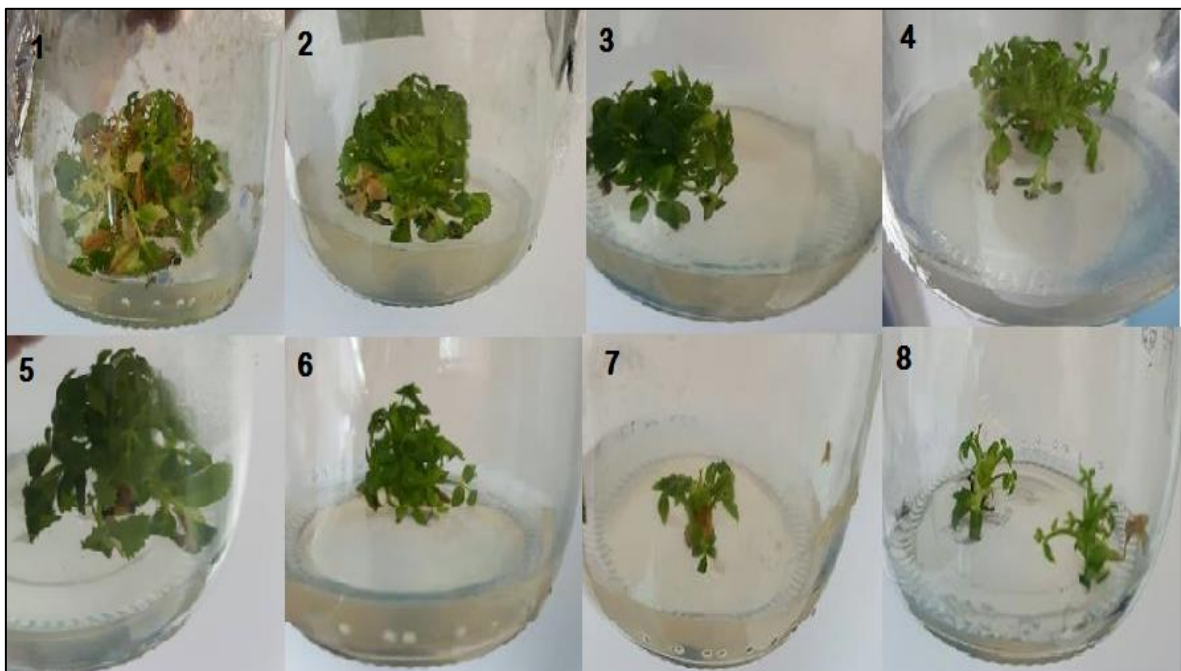


Figura 31: Explantes de “minirosas” en medios de multiplicación de brotes de acuerdo a la matriz del diseño experimental Plackett-Burman. Fila superior: Tratamientos 1-4 de acuerdo al diseño experimental Plackett-Burman (izq. der). Fila inferior: Tratamientos 5-8 de acuerdo al diseño experimental Plackett-Burman (izq. a der)



Figura 32: Explantes de “hibrido de té” en medios de multiplicación de brotes de acuerdo a la matriz del diseño experimental Plackett-Burman. Fila superior: Tratamientos 1-4 de acuerdo al diseño experimental Plackett-Burman (izq. der). Fila inferior: Tratamientos 5-8 de acuerdo al diseño experimental Plackett-Burman (izq. a der)

Los resultados del análisis de varianza y la prueba de Duncan indicaron una diferencia significativa ($p < 0.05$) de los tratamientos del diseño factorial de Plackett-Burman en la variable respuesta (número de brotes por tratamiento) lo que permite rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alternativa. De igual forma la desviación estándar de cada uno de los tratamientos indica un bajo grado de variación de los resultados, lo cual indica que este estudio tiene reproducibilidad y repetitividad.

Los resultados reflejados en las figuras 29 y 30, indican que en ambas variedades de rosa el tratamiento T1 presentó un mayor número de brotes esto probablemente debido a la composición del medio. Al tener una mayor concentración de 6-BAP (3 mg/L) junto con una concentración baja de kinetina (1 mg/L), se pudo promover la división celular del tejido vegetal. Debido a la combinación de dos citoquininas con una baja concentración de una auxina como ANA (0.01 mg/L) promovió la mitosis de las células y el crecimiento de un mayor número de brotes axilares, venciendo la dominancia apical. Un estudio realizado por Shimelis y otros (2014) estableció que existe un efecto significativo

en la interacción entre la 6-bencilaminopurina y la kinetina en el número de brotes por tratamiento de *Saccharum officinarum* L. Demostraron que un medio con una concentración de BAP de 2.5 mg/L y niveles bajos de kinetina (0.5 mg/L) fue el mejor tratamiento para multiplicación, obteniendo un promedio de 33.8 brotes por tratamiento en comparación con medios de cultivo solo con 6-BAP o solo con kinetina. Por otra parte, en otro estudio especificaron que en un medio suplementado con reguladores de crecimiento como 6-BAP, kinetina y ANA, las concentraciones de citoquininas y auxinas deben mantenerse en equilibrio, puesto que a concentraciones muy altas de citoquininas como 6-BAP, resulta tóxico para la planta y se inhibe la multiplicación de brotes; esto debido a que se interrumpe la síntesis proteica para la división celular, y a concentraciones muy altas de auxinas como ANA se induce la formación de callos en una variedad de rosa (*Rosa indica*) (Muiruri, SN., et al, 2011, pp. 678-693). La kinetina por otra parte, tiene un efecto menor que el 6-BAP por tal razón no influye por sí sola en la multiplicación de brotes. Sin embargo en combinación con 6-BAP puede aumentar su efecto y tener una mejor respuesta en cuando al número de brotes por tratamiento. Por otro lado, en concentraciones muy bajas o nulas de citoquininas no existe formación de brotes (Afanor, A, 2005, pp. 340-356). Por tal razón, los tratamientos T1, T2 y T5 mantuvieron los mayores promedios de números de brotes por tratamiento y los tratamientos T7 y T8 mantuvieron un bajo número de brotes por tratamiento en ambas variedades de rosa. Por otro lado, como se puede observar en las figuras 31A y 32A la mayoría de las hojas de los explantes se tornaron de un color amarillento. Esto debido a la gran cantidad de brotes generados, lo que provocó el agotamiento de los nutrientes del medio por parte de la planta y competencia por el espacio y los nutrientes. (Careli, B., y Echeverrigaray, S, 2002)

En cuanto a las concentraciones de sales inorgánicas como KNO_3 (2850 mg/L), KH_3PO_4 (340 mg/L) y NH_4NO_3 (1650 mg/L), del tratamiento T1, también tienen un efecto significativo en la multiplicación de brotes por tratamiento de "minirosas. En un estudio realizado por Zeng y otros (2013, pp.401-409) estableció que un incremento en el cociente entre las concentraciones de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ es un factor importante para la multiplicación *in vitro* de brotes de

Rosa x hybrida (minirosa roja), puesto que disminuye la multiplicación de brotes. De igual forma en otro estudio realizado se demostró que un alto contenido de fósforo en el medio estimula la multiplicación de brotes en *Rosa x hybrida* (Rutledge, D, 2008). Similares resultados se obtuvieron en este estudio, puesto que el tratamiento T1 presentó el mayor número de brotes por tratamiento de “minirosa” debido a un mayor contenido de potasio en el medio y un menor contenido de NH_4^+ .

Estudios realizados con *Rosa canina* demostraron que aumentando la concentración de sacarosa en el medio existe un mayor crecimiento de yemas axilares en menos tiempo debido a que aumenta el potencial osmótico en el medio de cultivo lo que acelera el desarrollo de brotes. (Jorquera, M, 2007)

5.2.3. Identificación de variables significativas

Para la identificación de las variables significativas en la multiplicación de brotes en “minirosas” e “híbrido de té” se realizó un diagrama de Pareto, de acuerdo a las variables establecidas en la matriz del diseño experimental de Plackett-Burman (tablas 3 y 4 capítulo III. Diseño experimental). El diagrama de Pareto indicó que las variables más influyentes estadísticamente en la multiplicación de brotes de “minirosas” son el 6-bencilaminopurina (6-BAP), la sacarosa, el nitrato de potasio (KNO_3) y el ácido naftalenacético (ANA) (figura 33A). Estos datos fueron obtenidos mediante el programa estadístico Minitab 17.

En “híbrido de té” las variables más significativas en la multiplicación de brotes fueron en primer lugar la sacarosa y en segundo lugar el 6-bencilaminopurina (figura 33B). La variable respuesta de ambas variedades de *Rosa hybrida* fue el número de brotes a los 45 días de siembra en medios de multiplicación (medio MS suplementado según los 8 tratamientos del diseño experimental Plackett-Burman). El análisis estadístico se realizó con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha = 5\%$).

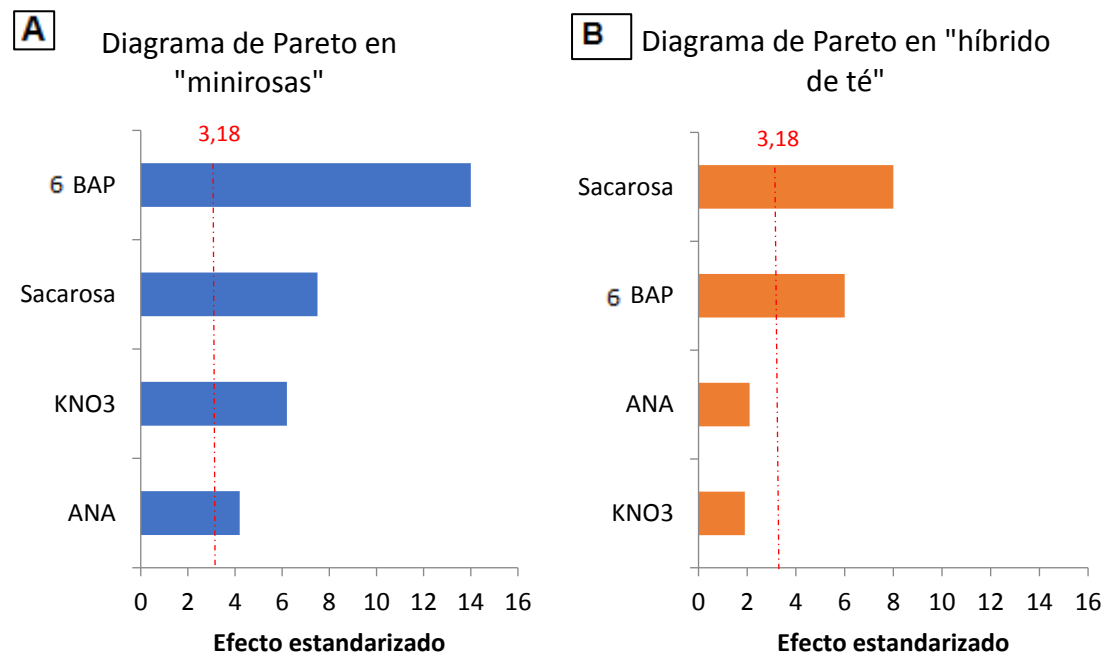


Figura 33: Diagrama de Pareto de efectos significativos de cada una de las variables planteadas en el diseño factorial de Plackett-Burman. (A) Diagrama de Pareto en "minirosas". (B) Diagrama de Pareto en "híbrido de té".

El diseño factorial Plackett-Burman indicó a través de los diagramas de Pareto que ambas variedades de rosa (figuras 33A y 33B) poseen tres variables significativas en común para la multiplicación de brotes de "minirosa" e "híbrido de té". Estas variables son 6-BAP, sacarosa y ANA.

Se han realizado varios estudios acerca del efecto del 6-BAP en el desarrollo de brotes axilares en explantes de variedades de rosas *in vitro*. En un trabajo de investigación realizado por Jayasree y otros (2008, pp. 56-68) evaluaron diferentes composiciones de medio MS suplementados con 2-4 mg/L de kinetina y 2-4 mg/L de BAP individualmente. Determinaron que el medio con 4 mg/L de 6-BAP promovió la inducción de múltiples brotes, en los medios suplementados con 2 mg/L de 6-BAP y 2 mg/L de kinetina presentaron brotes largos con el mayor número de hojas. Igualmente en otro estudio comparativo realizado por Nak Udom y otros (2009), evaluaron los efectos de algunos reguladores de crecimiento en un sistema de generación de brotes *in vitro* en *Rosa hybrida L.*, compararon la acción de cuatro citoquininas (6-BAP, kinetina, TDZ y zeatina) y determinaron que el efecto del TDZ era mejor en cuanto a la formación de brotes

en *Rosa hybrida L.* Sin embargo, este regulador provocaba que las hojas se tornaran de un color amarillento al cabo de algunos días inhibiendo su crecimiento a largo plazo. Por lo tanto, al igual que los resultados que obtuvieron Nak Udom y otros (2009, pp. 45-77)), los resultados obtenidos en el presente estudio indicaron que la citoquinina 6-BAP a una concentración de 3 mg/L junto con bajas concentraciones de ANA en medio MS era el mejor tratamiento para obtención de brotes *in vitro* de *Rosa hybrida L*

De igual forma en otro estudio realizado por Attia y otros (2012) establecieron un protocolo de multiplicación de brotes de *Rosa hybrida L.* donde evaluaron diferentes concentraciones y combinaciones de 6-BAP y kinetina en la formación inicial de brotes, multiplicación de brotes y enraizamiento. Para la fase inicial de formación de brotes establecieron que el mejor tratamiento tenía una concentración de 2 mg/L de BAP y 2 mg/L de kinetina, con lo cual obtuvieron 85% de formación de brotes. El menor porcentaje lo obtuvieron de un tratamiento sin reguladores de crecimiento. Sin embargo la mayor tasa de multiplicación de brotes fue del tratamiento con MS suplementado con 3 mg/L de BAP y 1 mg/L de kinetina mientras que la menor tasa de multiplicación de brotes fue del tratamiento 8 suplementado con 1 mg/L de BAP y 1 mg/L de kinetina. Similares resultados fueron obtenidos en este estudio, donde la concentración óptima de 6-BAP en el medio fue de 3 mg/L y la concentración menos eficiente fue de 1 mg/L. Sin embargo, Shabbir y otros (2009) determinaron que a pesar de que el 6-BAP es la mejor citoquinina en cuanto a multiplicación de brotes de *Rosa hybrida*, concentraciones muy altas de 6-BAP tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de brotes en el explante, puesto que un exceso de 6-BAP resulta tóxico para la planta lo que provoca marchitez de las hojas, necrosis y muerte del explante. También otros autores mencionan la formación de callos cuando la concentración de citoquininas es muy alta (Villanueva, F et al, 2013).

Los efectos de las citoquinas en la multiplicación de brotes a partir de yemas axilares, son varios, entre estos son: regulación de la división celular, diferenciación de tejidos y control de la senescencia celular. El 6-BAP al ser una citoquinina, participa en la fase M del ciclo de la mitosis, lo que favorece la división celular. (Godoy, L et al, 2005). Además, estimula el crecimiento del

explante aumentando su plasticidad, retrasan la senescencia celular sintetizando proteínas estabilizantes de clorofila y evita la degradación de otras proteínas existentes, también evitan el pardeamiento de las hojas puesto que en presencia de luz, el 6-BAP interviene en la síntesis y maduración de cloroplastos y favorece la producción de proteínas fotosintéticas. Otro efecto benéfico del BAP es la eliminación de radicales libres que producen la oxidación y necrosis. (Gonzalez, R et al, 2009).

En cuanto a la sacarosa, el tratamiento T1 presentó el mayor número de brotes en comparación con los otros tratamientos y el segundo mejor tratamiento fue el T2 en ambas variedades. Los dos tratamientos se componen de una alta concentración de sacarosa en el medio (50g/l), lo que se puede determinar que altas concentraciones de sacarosa inducen un mayor crecimiento de número de brotes en “minirosa” e “híbrido de té”. Se han desarrollado algunos trabajos de investigación sobre el efecto de distintas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo para propagación *in vitro* de especies vegetales. En estudio realizado por Borges y otros (2008, pp. 56-73) evaluaron el efecto de distintas concentraciones de sacarosa en la conservación *in vitro* de coco, donde determinaron que existe diferencia significativa mientras más alta es la concentración de sacarosa. Obtuvieron como resultados que una concentración de 60g/l de sacarosa en el medio produce una mayor multiplicación de brotes. El efecto de la sacarosa en la multiplicación de brotes puede atribuirse a los cambios causados en las fitohormonas endógenas de la planta lo que produce un mejor desarrollo de yemas axilares normales, esto posiblemente a una variación en el potencial osmótico del citosol o a la presencia de enzimas asociadas a la utilización de la sacarosa. (Borges et al., 2008, pp. 56-73). Sin embargo, en este estudio, se pudo observar que los explantes sembrados en los medios de multiplicación T1 y T2 desarrollaron hojas con una coloración amarillenta, especialmente en la variedad de “minirosa”. No obstante, dichos síntomas no fueron severos lo que no impidió que el material afectado continúe su crecimiento normalmente. Resultados similares obtuvieron Troncoso y otros (2014) cuando evaluaron el efecto de la sacarosa en cultivo *in vitro* de vid. Establecieron que las hojas de los explantes se tornaron de un color amarillento

debido al volumen de brotes originados por tratamiento. También hacen referencia que al existir una gran cantidad de hojas en un espacio pequeño se va a producir una competencia por espacio y nutrientes, lo que ocasiona que algunas hojas no dispongan de una mayor cantidad de clorofila y por ende pierdan su color verde. Igualmente en otro estudio realizado por Zeng y otros (2013, pp. 401-409) reportaron un protocolo de cultivo y floración *in vitro* para la variedad de “minirosa” donde la mejor concentración de sacarosa fue de 50 g/l con lo que obtuvieron un 52.33% de multiplicación en comparación con tratamientos con menores cantidades de sacarosa. Establecieron que en medios con concentraciones menores a 20g/l de sacarosa no existe formación de brotes.

A diferencia del 6-BAP y la sacarosa, la auxina ANA tuvo influencia solamente en la multiplicación de brotes de “minirosa” más no en “híbrido de té” esto posiblemente a que existe una diferencia entre la cantidad de auxinas endógenas de ambas variedades (Zeng, et al., 2013, pp. 401-409). La concentración de auxina en los medios T1 y T2 fue de 0.1 mg/L. Las concentraciones bajas de auxina en combinación con citoquininas promueve el desarrollo de múltiples brotes, puesto que induce la elongación de las células. (Attia et al., 2012, pp.764-795). Sin embargo, se ha demostrado en diversos estudios que altas concentraciones de auxina en el medio interfiere en la multiplicación de brotes, esto porque las auxinas como ANA mantienen la dominancia apical de las células, debido que su transporte es mediante un mecanismo dependiente de energía alejándose desde el punto apical de la planta hasta su base. Este flujo inhibe la formación de brotes axilares a lo largo del tallo y promueve la elongación. (Gonzalez et al., 1999, pp. 13-22). Por otro lado, se han reportado estudios donde indican que altas concentraciones de una auxina (ANA) o varias auxinas combinadas en el medio de cultivo inducen la formación de callos a partir de explantes de yemas axilares u hojas (Tang et al., 2004, pp. 94-113).

Por último, otra variable significativa en la multiplicación de brotes de “minirosa” es el nitrato de potasio (KNO_3). En el tratamiento T1 la concentración de KNO_3 en el medio fue de 2850 mg/L, por lo tanto la concentración de K^+ aumentó en el medio de cultivo, lo que posiblemente ocasionó un incremento en el número de brotes. El efecto del potasio en la multiplicación de brotes no ha sido

ampliamente estudiado, sin embargo se cree que tiene participación en la síntesis de ATP y en el potencial osmótico, brinda una mayor rigidez a los tejidos, estimula la síntesis de carbohidratos e interviene en la producción de clorofila. Por tal razón, una mayor concentración de potasio en el medio de cultivo estimuló el desarrollo temprano de brotes axilares de *Rosa x hybrida* (Texeira, D. , 2010).

5.3. Fase III: Establecimiento de un protocolo específico de multiplicación de brotes.

Se realizó el análisis estadístico ANOVA y la prueba de contraste de medias de Duncan a los resultados obtenidos a los 15 días de siembra en medios de multiplicación del diseño 2x2 para ambas variedades de *Rosa x hybrida*. El análisis estadístico indicó que si existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en cuanto a los tratamientos en ambas variedades, con lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa. También la desviación estándar de los tratamientos indica que no hay un alto grado de variación de los resultados de las repeticiones bajo las mismas condiciones, por lo que existe reproducibilidad y repetitividad de los tratamientos.

Las barras reflejadas en la figura 34A representan el promedio del número de brotes por tratamiento de “minirosa”, del diseño factorial 2^2 (Tabla 5 y 6 del capítulo III. Diseño experimental). Los resultados determinaron que el tratamiento TA (3 mg/L de BAP + 50 g/L de sacarosa) tuvo un mayor número de brotes por tratamiento con un promedio de 12.7 brotes a los 15 días de siembra, siendo este el tratamiento con mayor diferencia significativa según la prueba de contraste de medias de Duncan. El tratamiento TC obtuvo el segundo valor más alto de número de brotes por tratamiento de minirosa con un promedio de 7 brotes a los 15 días de la siembra. Seguido del tratamiento TB con un promedio de 3.4 brotes por tratamiento y por último el tratamiento TD presentó el menor número de brotes con un promedio de 2.6 brotes a los 15 días de siembra (Figura 35).

En cuanto al “híbrido de té” los resultados fueron similares a los de “minirosa”. Las barras reflejadas en la figura 34B representan el número de brotes por tratamiento de “híbrido de té”. Los resultados arrojaron que al igual que en “minirosas” el tratamiento TA presentó el mayor número de brotes con un promedio de 9.3 brotes por tratamiento, siendo este el tratamiento con mayor diferencia significativa según el análisis estadístico de la prueba de Duncan. El tratamiento TC presentó el segundo valor más alto de número de brotes, con un promedio de 6.6 brotes por tratamiento, seguido del tratamiento TD con un promedio de 2.1 brotes y por último el tratamiento TB con un promedio de 1.6 brotes a los 15 días de siembra (Figura 36).

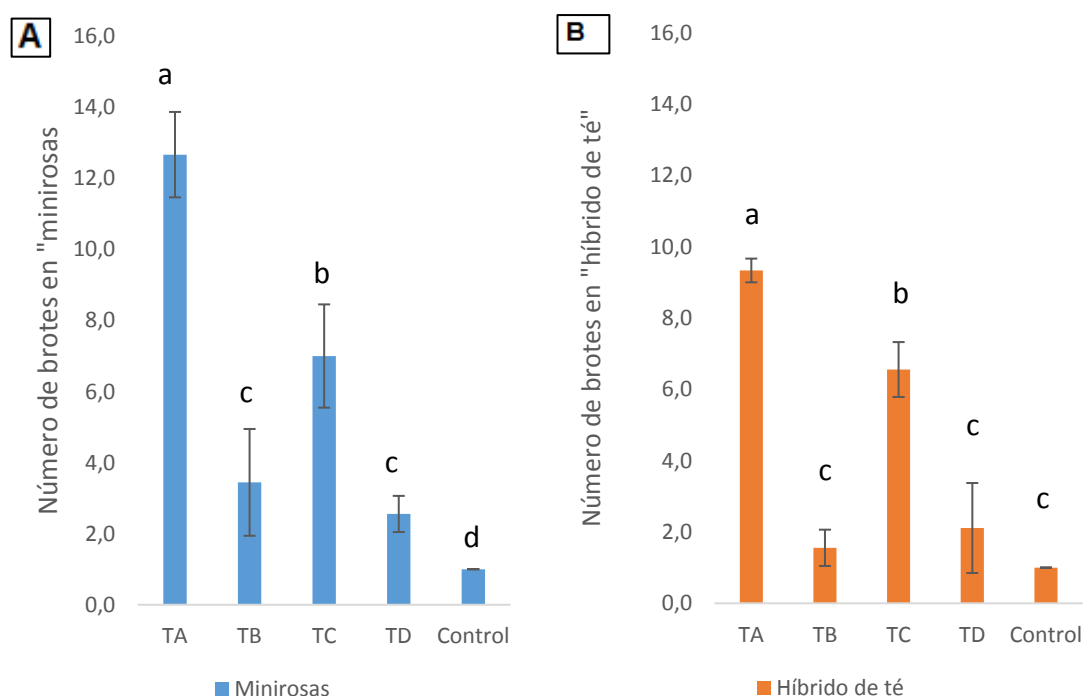


Figura 34: Número de brotes del diseño factorial 2x2 para la multiplicación de brotes de dos variedades de Rosa x híbrida (híbrido de té y minirosas) a los 15 días de siembra. (A) Número de brotes en “minirosas”. (B) Número de brotes en “híbrido de té”. Control: MS basal sin reguladores de crecimiento

- a) TA: 3mg/L 6-BAP + 50 g/L de sacarosa
- b) TB: 3mg/L de 6-BAP + 30 g/L de sacarosa
- c) TC: 1mg/L de 6-BAP + 50g/L de sacarosa
- d) TD: 1 mg/L de 6-BAP + 30 g/L de sacarosa
- e) Control: MS basal sin suplementos hormonales

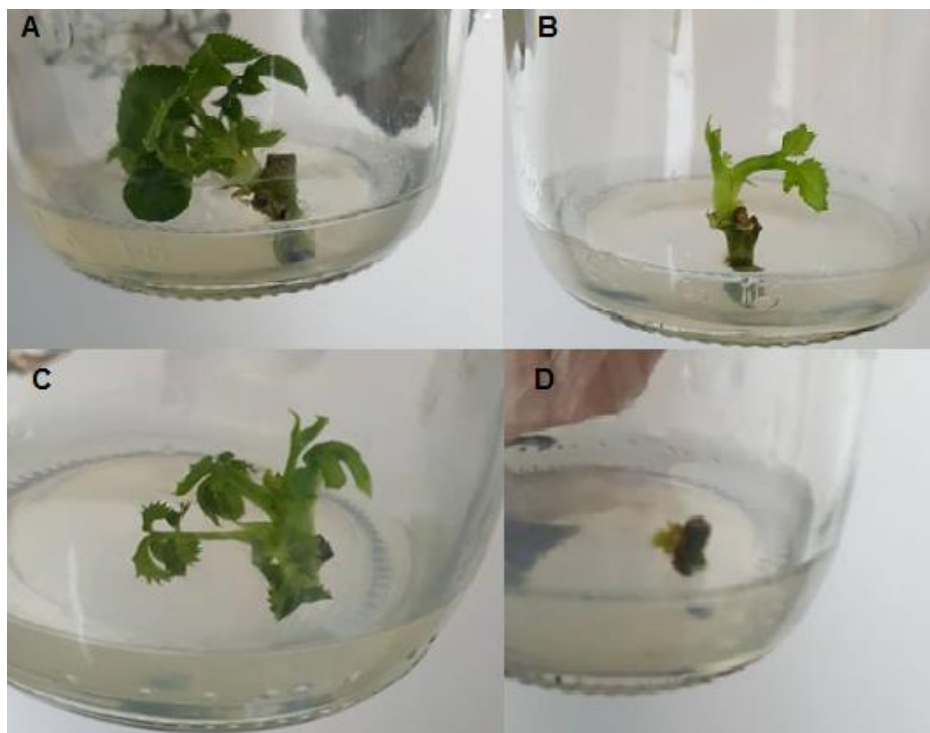


Figura 35: Explantes de “minirosa” en medios de multiplicación de brotes del diseño factorial 2x2. (A) Tratamiento TA, (B) Tratamiento TB, (C) Tratamiento TC (D) Tratamiento TD

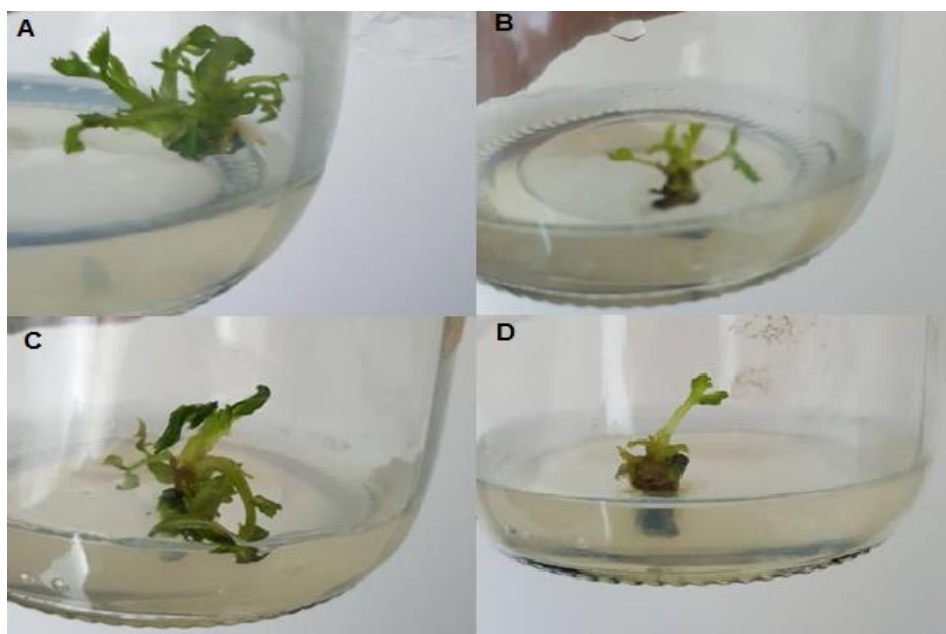


Figura 36: Explantes de “híbrida de té” en medios de multiplicación de brotes del diseño factorial 2x2. (A) Tratamiento TA, (B) Tratamiento TB, (C) Tratamiento TC (D) Tratamiento TD

Los tratamientos realizados en el diseño factorial 2x2 para el establecimiento de un protocolo específico de multiplicación de brotes, fueron formulados de acuerdo a las dos variables más significativas obtenidas en el diseño experimental Plackett-Burman (BAP y sacarosa). El tratamiento más eficiente en ambas variedades fue el tratamiento TA que tiene una combinación de 3 mg/L de 6-BAP y 50 g/L de sacarosa junto con 0.1 mg/L de ANA en medio MS, el cual presentó 12.2 brotes a los 15 días en la variedad “minirosa” y 9.3 brotes a los 15 días en la variedad “híbrido de té”. Por el contrario, el tratamiento menos eficiente para la obtención de múltiples brotes es el tratamiento TD en “minirosas” y el tratamiento TB en “híbrido de té”. El tratamiento TD presentó un promedio de 2.6 brotes a los 15 días en la variedad “minirosa” y el tratamiento 2 presentó un promedio de 1.6 a los 15 días. Por lo que se puede decir que niveles bajos de 6-BAP (1 mg/L) y sacarosa (30 g/L) en el medio, disminuye la velocidad de crecimiento de brotes obteniendo una baja tasa de multiplicación, mientras que a concentraciones altas de 6-BAP (3 mg/L) y sacarosa (50 g/L) incrementa la tasa de multiplicación de brotes en ambas variedades.

Resultados similares obtuvieron Nak-Udom y otros (2009, pp. 567-581) los cuales evaluaron 5 concentraciones de BAP (0, 1, 3, 6 y 9 mg/L), 5 concentraciones de ANA (0, 0.01, 0.1 y 1 mg/L) y 5 concentraciones de sacarosa (20, 30, 40, 50 y 60 g/L) para la micropropagación de la variedad de *Rosa hybrida* “perfume delight”. Obtuvieron un 100% de explantes con brotes formados en concentraciones de 3 mg/L de BAP, 0.01 mg/L de ANA y 60 g/L de sacarosa, con lo cual determinaron que dicha formulación de medio es la más eficiente para la multiplicación de brotes de *Rosa hybrida*.

Es importante recalcar que la formación de brotes, están determinados por el genotipo, tipo de explante, fitohormonas endógenas propias de la planta y hormonas exógenas añadidas al medio. Por lo que la respuesta a los reguladores de crecimiento, requerimientos nutricionales, concentración de sacarosa, condiciones físicas como la temperatura y la luz, entre otros, será diferente para cada genotipo. Por lo tanto, es necesario establecer un protocolo específico para cada uno ellos, con el objetivo de lograr tasas de multiplicación óptimas. (Venkatchalam , et al, 2009)

Conclusiones y recomendaciones

6.1. Conclusiones

Se logró identificar las variables significativas para la multiplicación de brotes *in vitro* de dos variedades de *Rosa x hybrida*. Estas variables fueron la 6-bencilaminopurina (6-BAP) y la sacarosa para ambas variedades; y el nitrato de potasio y el ácido naftalenacético (ANA) solamente para la variedad de “minirosa”. La concentración de 6-BAP óptima para la multiplicación de brotes fue de 3 mg/L y la de sacarosa fue de 50 g/L para ambas variedades. La concentración de nitrato de potasio recomendable en el medio de cultivo para la variedad de “minirosa” fue de 2850 mg/L y la de ANA fue de 0.1 mg/L. La citoquinina BAP y la sacarosa tuvieron una acción directa sobre el crecimiento de número de brotes, esto debido a que las citoquininas promueven la división celular mediante la síntesis de proteínas y la sacarosa mejora la capacidad fotosintética de la planta.

Se estableció un protocolo de desinfección de explantes de yemas axilares para ambas variedades de *Rosa x hybrida*, mediante el cual se obtuvo un 50% y 63.3% de explantes viables para “minirosa” e “híbrido de té” respectivamente. El mejor tratamiento de desinfección fue el tratamiento 3 para ambas variedades, compuesto por una concentración de hipoclorito de sodio de 10% v/v con un tiempo de inmersión de 10 minutos.

Se determinó que el tratamiento T1 tuvo la mayor velocidad de crecimiento, con un desarrollo de 1.6 mm.día⁻¹ en “minirosa” y 1.2 mm.día⁻¹ en “híbrido de té”. De igual forma, el tratamiento T1 presentó la mejor tasa promedio de multiplicación de brotes a los 45 días, con un promedio de 46.7 brotes por tratamiento en “minirosa” y 39.7 brotes por tratamiento en “híbrido de té”. La combinación y concentraciones de reguladores de crecimiento, sales inorgánicas y sacarosa en el medio de cultivo del tratamiento T1, favoreció el crecimiento de los explantes en ambas variedades, debido a que este tratamiento presentó los requerimientos nutricionales necesarios de la “minirosa” e “híbrido de té”.

Finalmente, se logró establecer un protocolo específico de multiplicación de brotes para ambas variedades de rosa, a partir de las variables significativas obtenidas en la fase II con el diseño experimental Plackett-Burman. Se encontró el balance adecuado entre los reguladores de crecimiento (6-BAP y ANA) y la concentración de sacarosa lo que permitió la obtención de múltiples brotes de ambas variedades de *Rosa x hybrida*. Se determinó que el tratamiento TA (MS suplementado con 3 mg/L de BAP, 50 g/l de sacarosa y 0.1 mg/L de ANA) tuvo el mayor crecimiento de número de brotes por tratamiento en 15 días en ambas variedades con un promedio de 12.7 brotes por tratamiento en “minirosas” y 9.3 brotes por tratamiento en “híbrido de té” . .

6.2. Recomendaciones

Se recomienda la aplicación de una solución de antibiótico en la fase de desinfección de yemas axilares de rosa, para lograr eliminar la contaminación bacteriana en su totalidad y por ende aumentar el porcentaje de viabilidad de los tratamientos.

En la fase de multiplicación se recomienda cambiar de medio de cultivo a los explantes cada dos semanas debido a que el acelerado crecimiento del número de brotes, puede ocasionar el agotamiento de nutrientes del medio, causando la marchitez o muerte del explante.

Se recomienda la continuidad de este estudio a un proceso de floración *in vitro* de ambas variedades de rosa estudiadas.

REFERENCIAS

- Abdelnour, A y Escalant, J. (1994). Annual Report. En A. y. Abdelnour. Costa Rica: Tropical agricultural research and higher education center.
- Afanador, A. (2005). *Propagacion in vitro a partir de meristemos de cinco variedades comerciales de Dianthus caryophyllus*. Bogota, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Alev, C. y Orhan, A. (2016). *Efficient Micropropagation of English Shrub Rose "Heritage" Under in Vitro Conditions* . Int. J. Agri. Biol., Vol. 8, No. 5.
- Arzate, A., et al. (2014). Tecnicas tradicionales y biotecnologicas en el mejoramiento genético del rosal (Rosa spp). D.F Mexico: Universidad Autonoma del Estado de Mexico.
- Attia, O., et al. (2012). *In vitro propagation of Rosa hybrida L. cv. Al-Taif Rose plant*. Kingdom of Saudi Arabia: Biotechnology and Genetic Engineering Unit, Scientific Research Centre, Taif University.
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía mesoamericana* 20.
- Bale, S y Durham, R. (2011). *Roses. The Arboretum: Horticulture; T. Phillips, Plant and Soil Sciences; L. Townsend, Entomology*.
- Blázquez, M. (2010). Bases moleculares de la floración. Madrid: Ciencia al Día Internacional .
- Borges, G et al. (2008). Efecto de distintas concentraciones de sacarosa en la conservación in vitro de coco (cocos nuciferas L.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. X, núm. 2.
- Borges, M., et al. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo in vitro de Dioscorea alata L. clon Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo in vitro de Dioscorea alata L. clon caraqueño. Bogota, Colombia: Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de

Granma, Bayamo Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Granma, Bayamo.

- Bouzo, C y Gariglio, N. (2009). Cultivo de rosas en invernaderos. Lima, Peru.
- Cardenas, J., et al. (2009). Efecto del ácido giberélico y la 6-bencilaminopurina sobre el desarrollo de yemas Rosas (*Rosa x kybrida*). Bogota, Colombia: Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia.
- Cárdenas-Navarro, R. (2011). *Vegetative propagation of rose: effects of substrate, light and leaf persistence*. Michoacán, México.: Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Careli, B., y Echeverrigaray, S. (2002). An improved system for the in vitro propagation of rose cultivars. *Scientia Horticulturae*, vol.92.
- Carranza, M., et al. (2013). Propagación clonal in vitro de swietenia macrophylla king (caoba). Quevedo, Los Ríos, Ecuador.: Dirección de Investigación Científica y Tecnológica, Laboratorio de Biotecnología, Universidad Técnica Estatal de Quevedo.
- Castilla, J. (2005). *Cultivo de tejidos de rosas (rosa sp): un acercamiento a investigaciones recientes*. La Habana, Cuba: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
- Causiera, B., et al. (2010). *Floral organ identity: 20 years of ABCs*. Seminars in Cell & Developmental Biology, In Press.
- Clerque, K. (2014). La industria de las rosas en el Ecuador. Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Coen, E., y Meyerowitz, E. (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*.
- Couselo, J., et al. (2010). *Aplicación del cultivo in vitro de tejidos vegetales en estudios de fitorremediación*. Pontevedra, España: Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC.

- Dirección de Gestión de Desarrollo Comunitario e Inclusión Social. (2012). Plan de desarrollo y ordenamiento territorial de la parroquia nayón. Quito: Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial de Nayon.
- Dirección de inteligencia comercial e inversiones. (2013). *Análisis sectorial de flores*. Recuperado de http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/07/PROEC_AS2013_FLORES.pdf
- Dohare, S., et al. (1991). *Micropropagation in roses*. India: Division of Floriculture and Landscaping.
- Duarte, A. (octubre de 2015). *Multiplicación de rosas por esquejes o estacas*. Obtenido de <http://bibliotecadeamag.wikispaces.com/file/view/Multiplicaci%C3%B3n+de+rosas+por+esquejes+o+estacas+Y+OTROS+SOBRE+ROSAS.pdf>
- Erazo, H. (julio de 2011). *Rosas-Rosales (parte I) Descripción & Características*. Obtenido de Plantas y Jardín: Pasión por la jardinería: <http://plantasyjardin.com/2011/07/rosas-rosales-descripcion-caracteristicas/>
- Ertola, J., et al. (2015). Cultivo in vitro de tejidos vegetales. Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de la Plata.
- Esau, K. (1988). Anatomía de las plantas con semilla. Hemisferio Sur.
- Espinosa, Ed. (2015). Evaluación de cuatro labores agronómicas, para la inducción temprana de brotación de yemas de producción, en dos variedades de rosa (*Rosa* spp.). Quito, Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana.
- Fernández, G y Johnston, M. (1986). Fisiología vegetal experimental. San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura.
- García, D. (2015). Manejo de injertos en rosa, en una finca comercial de la sabana de Bogotá. Bogotá: facultad de ciencias básicas y aplicadas-universidad militar nueva granada.

- Godoy, L et al. (2005). Efecto de los reguladores del crecimiento en la multiplicación In Vitro DE *Mentha piperita* Y *Mentha citrata*. *Cultivos Tropicales*, vol. 26, núm. 1.
- Gonzalez, A., et al. (octubre de 1999). Hormonas de las plantas. Obtenido de <http://www.efn.uncor.edu/departamentos/biologia/intrbiol/auxinas.htm>
- Gonzalez, R et al. (2009). La citocinina BAP promueve la acumulación de hexosas e incrementa la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxicinasas durante el retraso de la senescencia foliar de trigo. Montecillo, Estado de México.: Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados.
- Gostinchar, J. (1954). El cultivo del rosal. Madrid, España.: Ministerio de la Agricultura: Publicaciones de capacitación agrícola.
- HADI ABOOD AL-MAAMORY, K. (2011). *In vitro micropropagation of two rose (rosa sp.) cultivars*. Republic of Iraq : Ministry of Higher Education and Scientific Research Foundation of Technical Education, Al-Musaib Technical College .
- Hameed, N et al. (2011). *In vitro micropropagation of disease free rose (Rosa indica L.)*. Lahore, Pakistan: Department of Mycology & Plant Pathology, University of the Punjab Lahore, Pakistan.
- Harrison, K et al. (2005). *The biology and ecology of Rosa x hybrida (Rose)*. Sidney, Australia: Department of health and Ageing office of the gene technology regulator.
- Hernandez, Y., y Gonzalez, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes . La Habana: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA).
- Hong Vu, N., et al. (2006). *The role of sucrose and different cytokinins in the in vitro floral morphogenesis of rose (hybrid tea) cv. "First Prize"*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*.

- Horibe, T y Yamada, K. (2015). *Molecular Genetic Studies on Continuous-Flowering Roses that Do Not Originate from Rosa chinensis*. Japan: Debener and Linde.
- Ibrahim, R y Debergh, P. (2000). *Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from in vitro leaf explants of roses (Rosa hybrida L.)*. Selangor, Malaysia: Division of Agrotechnology and Biosciences, Malaysian Institute for Nuclear Technology Research,.
- Iwata, H., et al. (2012). The TFL1 homologue KSN is a regulator of continuous flowering in rose and strawberry. *The Plant Journal 2011 Blackwell Publishing Ltd*.
- Jayasree, N et al. (1998). *Rapid in vitro propagation of Rosa hybrida through axillary buds*. India: Indian Journal of Horticulture.
- Jorquera, M. (2007). *In vitro micropropagation of rose rootstock (Rosa canina) [BAP, GA3]*. Quillota, Chile: Universidad Catolica de Valparaiso.
- Krzymuski, M. (2016). *Molecular determinants involved in the quantitative relationship between flowering time and photoperiod in Arabidopsis thaliana*. Buenos aires: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Kumud,S et al. (2015). *Micropropagation of rose cultivars : biotechnological application to floriculture*. Uttarakhand,India: Department of Biotechnology, Shri Guru Ram Rai (PG) College, Pathri Bagh, Dehradun.
- Lopez, P., et al. (2008). Evaluación de preservantes florales en la poscosecha de tres variedades de clavel estándar. Bogota: Universidad Pedagógica Nacional, Bogotá.
- Marco, M y Martinez, R. (21 de octubre de 2015). *El Jardín de la Alegría*. Obtenido de Morfología del rosal: <http://eljardindelaalegriaenmadrid.blogspot.com/2015/10/morfologia-del-rosal.html>

- Mendez, G. (Diciembre de 2012). Influencia de la temperatura ambiental en las plantas. Obtenido de http://www.canna.es/influencia_temperatura_ambiental_en_las_plantas
- Montenegro, A. (enero de 2016). El rosal. Obtenido de Bioenciclopedia: <http://www.bioenciclopedia.com/rosa/>
- Montero, W y Jimenez, V. (2009). Floración in vitro – revisión de literatura. San Carlos: Escuela de Agronomía, Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Muiruri, SN., et al. (2011). *Micropropagation protocols using nodal explants of selected rose (rosa hybrida) cultivars*. Nairobi, Kenya.: Institute for Biotechnology Research, Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology.
- Murashige, T y Skoog, F. (1962). A revised medium for growth and bio assays with Tobacco Tissue culture. *Physiologia Plantarum Vol 15*.
- Nagar, P.K, et al. (2007). *Rose: Some important findings with special reference to physiology of flowering*. Global Science: Floriculture and Ornamental Biotechnology.
- Nak-Udom, N et al. (2009). *Micropropagation from cultured nodal explants of rose (Rosa hybrida L. cv. 'Perfume Delight')*. Thailand: Prince of Songkla University.
- Navarro, P y Lopez, L. (2011). Vegetative propagation of rose: effects of substrate, light and leaf persistence. *Scientia Agropecuaria 2*.
- Perez, J., et al. (1993). Empleo del hipoclorito de sodio NaOCl en sustitución del flameo en el cultivo de . Villa Clara-Cuba: Universidad Central Marta Abreu.
- Plackett, R., y Burman, J. (1946). *The design of optimum multifactorial experiments*. oxford university .
- Portillo, G. (1999). Respuesta de tres cultivares de rosal (Rosa spp) a la multiplicación y enraizamiento de brotes in vitro en diferentes

proporciones de auxinas y citoquininas. Guatemala: Facultad de agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala.

PRATHEESH, P y KUMAR, A. (2012). *In vitro flowering in rosa indica l.* Kottayam, India: School of Biosciences, Mahatma Gandhi University.

Preece, J. y Compton, M. (1991). Problems with explant exudation in micropropagation. *Biotechnology in agriculture and forestry. vol. 17. High-tech and micropropagation I.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Pujana, I. (2011). Todo sobre las rosas. *El jardín del bolsillo.* Lima: La Nación.

Rama Sri, K et al. (2012). *In vitro flowering - A review .* Journal of Agricultural Technology 2012 Vol. 8

Ramos, J. (2012). Avances de la micropropagación in vitro de plantas leñosas. bogotá: universidad nacional abierta y a distancia.

Randoux, M., et al. (2014). *RoKSN, a floral repressor, forms protein complexes with RoFD and RoFT to regulate vegetative and reproductive development in rose.* New Phytologist Trust.

Raya Montaña, Y., et al. (2009). Cinética de enraizamiento in vitro de portainjertos de vid en respuesta a la fuente y concentración de azúcar. Mexico: Facultad de Agrobiología Presidente Juárez, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Razavizadech, R y Ehsanpour, A. (2008). *Optimization of in vitro Propagation of Rosa hybrida L. Cultivar Black Red.* Isfahan, Iran: Departament of Biology, Isfahan University.

Reyes, M. (2014). Evolución del mercado de flores en Sudamérica. Obtenido de <http://www.expoflores.com/index.php/servicios/int-mec/99-evolucion-del-mercado-de-flores-en-sudamerica>

Romero Arias, J et al. (2010). Modelo de diferenciación celular en la floración de *Arabidopsis thaliana*. Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, vol. 13.

- Rutledge, D. (2008). *Micropropagation of floribunda, ground cover and miniature roses*. Plant Cell Tissue Organ Cult.
- SACSA. (2010). Ventajas y desventaja de los injertos. Obtenido de <http://www.gruposacsa.com.mx/ventajas-y-desventaja-de-los-injertos/>
- Salehi, H., et al. (1997). *A simple procedure for disinfection of 'Baby Masquerade' miniature rose explants*. Iran Islamic Republic: Departamento de agricultura, Khosh-Khui, M.
- Salisbury, F., y Ross, C. (1994). *Fisiología Vegetal*. Mexico: Grupo Editorial Iberoamericana S.A.
- Sallinger, J. (1991). *Producción comercial de flores*. España: Acriba, S.A.
- Schuch, U. (2014). *Growing and caring for roses*. Tucson, AZ: Plant sciences Department, University of Arizona.
- Shabbir, A., et al. (2009). *Effect of different cultural conditions on micropropagation of rose (rosa indica L.)*. Pakistan: Institute of Mycology & Plant Pathology, University of the Punjab Lahore.
- Shimelis, D., et al. (2014). *Interaction Effects of 6-Benzylaminopurine and Kinetin on In vitro Shoot Multiplication of Two Sugarcane (Saccharum officinarum L.) Genotypes*. Jimma, Ethiopia: Jimma University College of Agriculture and Veterinary Medicine.
- Silvestre, S y Monserrat, P. (2008). *El Rosal L*. Caracas, Venezuela.
- Sisco, M. (2011). *Micropropagation of roses (Rosa spp.): The effects of different media on in vitro rooting*. Slovenia: University of Maribor, Faculty of Agriculture and Life Sciences.
- Soomro, R., et al. (2003). *In vitro propagation of Rosa indica*. Khaipur, Pakistan: Department of botany, Shah Abdul Latif University.
- Sri Rama, K et al. (2012). In vitro flowering- A review. *Journal of Agricultural Technology Vol 8*.

- Suarez, R. (Marzo de 2016). Nutrición de las plantas: Principales nutrientes y funciones. Obtenido de <http://agrichem.mx/nutricion-de-las-plantas-principales-nutrientes-y-funciones/>
- Tang, W., et al. (2004). *Antioxidants enhance in vitro plant regeneration by inhibiting the accumulation of peroxidase in Virginia pine (Pinus virginiana Mill.)*. Plant Cell Rep.
- Taylor, J y Kittas, C. (2013). *Good Agricultural Practices for greenhouse vegetable crops - FAO*. FAO.
- Texeira, D. . (2010). *Nutricion Vegetal*. Obtenido de <http://www.fagro.mx/nutricion-vegetal.html>
- Tipan, J. (2015). Estudio fenológico y productivo de diez variedades de rosa rosa sp.), en dos ciclos de producción en cayambe. Quito, Ecuador: Universidad central del ecuador, Facultad de ciencias agrícolas.
- Troncoso, A., et al. (2014). Influencia de la concentracion de sacarosa en el medio, sobre la respuesta de material de vid "in vitro". Sevilla, España.
- Uribe, M., et al. (2008). Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento in vitro de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. Chile: Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales.
- Vásquez, L. (2016). Cultivo de rosas en Ecuador. Quito: Pontificia Universidad Católica de Ecuador.
- Venkatchalam , et al. (2009). *Plant tissue culture and molecular markers*. India: International publishig house Pvt. Ltd.
- Villanueva, F et al. (2013). Efecto de auxinas y citoquininas en el cultivo de tejido de *ahnfeltia plicata*. Puerto Montt, Chile: Instituto de Ciencia y Tecnología, Universidad Arturo Prat.
- Wang, G., et al. (2002). *In vitro flower induction in roses*. Singapore: Institute of Molecular Agrobiolgy, 1 Research Link, The National University of Singapore.

- Weldt, S. (2008). Establecimiento, multiplicación y enraizamiento in vitro de Rosa canina L. . Valdivia, Chile: Escuela de Agronomía - Universidad Austral de Chile.
- Williams, T. (2008). *Rosas maravillosas*. USA: Universidad de California.
- Xotla, P. (2010). Producción y comercialización de rosa de corte en el rancho “los morales” de tenancingo, edo. de México. Veracruz, Mexico: Universidad de Veracruz.
- Yong, A. (2004). El cultivo del rosal y su propagación. La Habana, Cuba: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
- Zeng, Z et al. (2013). *In vitro flowering red miniature rose*. Miki-cho, Kagawa, Japan: Key Laboratory of South China Agricultural Plant Genetics and Breedin.

ANEXOS

Anexo 1

Tabla 6:

Composición de macro y micronutrientes de medios de cultivo Murashige y Skoog basal.

Macronutrientes	
Elemento	Concentración (mg/L)
CaCl ₂	332
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1900
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
NH ₄ NO ₃	1650
Micronutrientes	
Elemento	Concentración (mg/L)
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
MnSO ₄ · H ₂ O	16,9
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6
Na ₂ EDTA	27,8

Tomado de Murashige, T y Skoog, F, 1962.

