

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
CARRERA DE INGENIERIA AGRONOMICA



TESIS DE GRADO

**EVALUACIÓN DE TRES NIVELES DE AUXINAS Y CITOQUININAS PARA LA  
OBTENCIÓN DE PLANTAS MADRE DE ROSA (*Rosa sp.*) VARIEDAD  
FREEDOM EN CONDICIONES IN VITRO.**

PRESENTADO POR:

**MARIA ELENA JACINTO ALCAZAR**

LA PAZ – BOLIVIA

2018

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
CARRERA DE INGENIERIA AGRONOMICA

**EVALUACIÓN DE TRES NIVELES DE AUXINAS Y CITOQUININAS PARA LA  
OBTENCIÓN DE PLANTAS MADRE DE ROSA (*Rosa sp.*) VARIEDAD  
FREEDOM EN CONDICIONES IN VITRO.**

Tesis de Grado presentado como requisito  
Parcial Para optar el título de  
Ingeniero Agrónomo

Presentado por:

**MARIA ELENA JACINTO ALCAZAR**

Asesor (es):

Ph.D. MVZ. Celso Ayala Vargas .....

Ing. Marizol Nina Gutierrez .....

Tribunal examinador:

Ph.D.BQMC.Alberto Figueroa Soliz .....

Ing. M. Sc. Rubén Jacobo Trigo Riveros .....

Ing. Esther Tinco Mamani .....

Aprobada:

Presidente tribunal examinador: .....

La Paz – Bolivia

2018

## *DEDICATORIA*

*Dedicado a Dios por guiarme en el camino correcto, por la fuerza que me dio para poder levantarme durante la adversidad, por enseñarme a persistir y nunca desistir.*

*Con mucho amor a mi Padre Marcelino Jacinto Mamani y a mi querida Madre Maxima Alcazar Copaja, quienes con mucho cariño y dedicación estuvieron presentes a lo largo de mi formación personal enseñándome el valor de la humildad y honestidad.*

*A mis hermanos Ramiro Jacinto Alcazar y Fernando Gonzalo Jacinto Alcazar por la paciencia y comprensión.*

*“Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo en dondequiera que vayas. Josué 1: 9”*

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente dar gracias a ti mi querido Dios por todas las bendiciones, y por ayudarme a lograr la meta más anhelada, hay mucho aun por recorrer pero sé que cada paso que dé será de acuerdo a tu voluntad.

Agradecer a la Universidad Mayor de San Andrés, y sobre todo a la Facultad de Agronomía por la formación Académica brindada durante mi vida Universitaria.

Dar gracias a mis Asesores Ph.D. MVZ. Celso Ayala Vargas por todo el apoyo y conocimientos prestados para la culminación de mis tesis de grado y a la Ing. Marizol Nina Gutierrez por su colaboración.

Agradecer a mis Revisores Ph.D.BQMC. Alberto Figueroa Soliz, Ing. M. Sc. Rubén Jacobo Trigo Riveros y a la Ing. Esther Tinco Mamani por su recomendación acertada y su tiempo brindado.

A mis docentes de la carrera de Ingeniería Agronómica por todos los conocimientos inculcados a lo largo de mi formación Académica, en especial al Ing. M.Sc.Paulino Ruiz Huanca, MVZ. René Condori por todos los consejos y conocimientos brindados y al Ing. Rafael Adolfo Murillo García por haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

.

## INDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Antecedentes.....	2
1.2. Justificación .....	3
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo general .....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. Características botánicas del cultivo de rosas.....	5
3.1.1. Usos .....	6
3.1.2. Características de la variedad Freedom.....	6
3.2. Macropropagación.....	7
3.2.1. Acodos .....	7
3.2.2. Injertos de yemas .....	7
3.2.3. Estacas .....	8
3.3. Generalidades del cultivo in vitro.....	8
3.4. Métodos de regeneración de plantas .....	10
3.4.1. Organogénesis .....	10
3.4.2. Embriogénesis somática .....	12
3.5. Aplicaciones del cultivo de tejidos .....	13
3.5.1 obtención de plantas libres de patógenos .....	13
3.5.2. Propagación masiva.....	13
3.5.3. Conservación de germoplasma.....	14

3.6. Micropropagación .....	14
3.6.1. Ventajas de la Micropropagación .....	16
3.6.2. Factores limitantes de la micropropagación .....	17
3.7. Fases de la Micropropagación.....	17
3.7.1. Fase 0 selección de materiales vegetales.....	17
3.7.2. Fase I Establecimiento .....	18
3.7.3 Fase II Multiplicación.....	19
3.7.4. Fase III Enraizamiento .....	20
3.7.5. Fase IV Aclimatación.....	20
3.8. Cultivo de meristemas .....	20
3.9. Explante.....	22
3.10. Oxidación Fenólica .....	22
3.11. Medios de cultivo.....	23
3.12. Composición el medio de cultivo .....	24
3.12.1. Sales inorgánicas .....	24
3.12.2. Compuestos orgánicos.....	25
3.12.3. Fuentes de carbono .....	25
3.12.4. Reguladores de crecimiento.....	26
3.12.5. Agentes gelificantes .....	28
3.13.6 pH del medio de cultivo .....	29
4. LOCALIZACIÓN .....	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5.1. Materiales .....	30
5.1.1. Materiales para la preparación de medio de cultivo .....	30

5.1.2. Materiales para la preparación de medios de desinfección.....	30
5.1.3. Materiales para la introducción de explantes .....	31
5.1.4. Materiales de la sala de crecimiento .....	31
5.1.5. Material de escritorio .....	31
5.1.6. Material vegetal .....	32
5.2. Metodología.....	32
5.2.1. Procedimiento experimental (Etapa 0) .....	32
5.2.2. Establecimiento del material vegetal a condiciones in vitro (Etapa I) ..	32
5.3. Diseño experimental.....	40
5.3.1. Modelo lineal aditivo .....	40
5.3.2. Factor de estudio.....	40
5.3.3. Tratamientos .....	41
5.3.4. Variables de respuesta.....	42
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	44
6.1. Brotación de los explantos.....	44
6.2. Porcentaje de supervivencia.....	45
6.3. Porcentaje de contaminación .....	46
6.5. Porcentaje de oxidación .....	47
6.6. Altura de planta .....	49
6.7. Número de hojas .....	53
7. CONCLUSIONES.....	57
8. RECOMENDACIONES.....	59
9. BIBLIOGRAFÍA .....	60
ANEXO.....	65

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Factor de Estudio.....	41
<b>Cuadro 2.</b> Tratamientos en Estudio de las Concentraciones de Hormonas.....	42
<b>Cuadro 3.</b> Porcentaje de Contaminación de las Vitroplantas de Rosa.....	46
<b>Cuadro 4.</b> Porcentaje de Oxidación de las Vitroplantas de Rosa de la Variedad Freedom.....	48
<b>Cuadro 5.</b> Análisis de Varianza para la Altura de Vitroplantas.....	49
<b>Cuadro 6.</b> Prueba Duncan para el Factor B: Citoquinina (BAP).....	50
<b>Cuadro 7.</b> Prueba Duncan para el factor A* Factor B:( ANA*BAP).....	51
<b>Cuadro 8.</b> Análisis de Varianza para el Numero de Hojas.....	53
<b>Cuadro 9.</b> Prueba Duncan para el Factor B (Citoquinina).....	54
<b>Cuadro 10.</b> Prueba Duncan para el Factor A* Factor B: (ANA*BAP).....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Ubicación Referencial De La Facultad De Agronomía UMSA.....	29
<b>Figura 2.</b> Pesado de los Reactivos que Compone el Medio de Cultivo.....	32
<b>Figura 3.</b> Adición de Reguladores de crecimiento y Aforado del Medio de Cultivo.....	33
<b>Figura 4.</b> Estabilización de Ph.....	34
<b>Figura 5.</b> Tapado y Sellado de vasos con contenido de Medio de Cultivo.....	35
<b>Figura 6.</b> Autoclavado de Medios de Cultivo.....	35
<b>Figura 7.</b> Muestras de Rosa variedad Freedom para el Establecimiento In Vitro.....	36
<b>Figura 8.</b> Sumersion de Muestras de Rosa variedad Freedom en Alcohol e Hipoclorito de sodio.....	37
<b>Figura 9.</b> Esterilizacion de los Materiales para la Introducción de Explantes de Rosa variedad Freedom.....	38
<b>Figura 10.</b> Siembra de Explantes de Rosa variedad Freedom al medio de Cultivo.....	39
<b>Figura 11.</b> Presencia de Hongos en las Hojas de Rosa variedad Freedom.....	43
<b>Figura 12.</b> Oxidacion en el Área Basal del Explante de Rosa.....	43

<b>Figura13.</b> Porcentaje de Brotación de Expantes de Rosa variedad Freedom.....	44
<b>Figura 14.</b> Porcentaje de Supervivencia de Explantes de Rosa variedad Freedom.....	45
<b>Figura 15.</b> Efecto de los Tratamientos Altura de Vitroplantas.....	52
<b>Figura 16.</b> Efecto de Tratamientos Número de Hojas.....	55

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Página</b>
<b>Anexo N°1</b> Rosas de la variedad Freedom.....	66
<b>Anexo N°2</b> Recolección de las muestras más vigorosas.....	66
<b>Anexo N°3</b> muestras para la introducción al medio de cultivo.....	67
<b>Anexo N° 4</b> Pesado de reactivos.....	67
<b>Anexo N° 5</b> Preparación del medio de cultivo.....	68
<b>Anexo N°6</b> Introducción del medio de cultivo al autoclave.....	68
<b>Anexo N°7</b> Autoclavado de los medios de cultivo.....	69
<b>Anexo N°8</b> Preparado de los medios desinfectantes.....	69
<b>Anexo N°9</b> Desinfección de los explantes.....	70
<b>Anexo N°10</b> Introducción del material vegetal.....	70
<b>Anexo N°11</b> Desarrollo de las vitroplantas.....	71
<b>Anexo N°12</b> Presencia de hongos.....	71
<b>Anexo N°13</b> Prueba de Ch Cuadrado variable Brotación.....	72
<b>Anexo N°14</b> Prueba de Ch Cuadrado variable Sobrevivencia.....	72
<b>AnexoN°15</b> Prueba de Ch Cuadrado variable Contaminación.....	72
<b>Anexo N°16</b> Prueba de Che Cuadrado variable Oxidación.....	73

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación titulado Evaluación de tres niveles de auxinas y citoquininas para la obtención de plantas madre de Rosa (*Rosa* sp.) variedad Freedom en condiciones in vitro, fue realizado en la Facultad de Agronomía-UMSA, donde los objetivos fueron los siguientes: evaluar el desarrollo de explantes de Rosa (*Rosa* sp.) variedad Freedom en el medio de cultivo establecido, evaluar el riesgo de contaminación y oxidación en la fase de establecimiento del cultivo de Rosa (*Rosa* sp.) variedad Freedom, encontrar la concentración óptima de auxinas y citoquininas para el establecimiento de Rosa (*Rosa* sp.) de la variedad Freedom en condiciones invitro, donde se utilizó como material vegetal a introducir yemas laterales de Rosa (*Rosa* sp.). Los tratamientos fueron distribuidos en un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial, con nueve tratamientos y diez repeticiones, donde cada tratamiento estaba conformado por distintos niveles de concentración de BAP (6-Benzil amino-purina) ANA (Ácido Naftalenacético). Donde se determinó con mayor altura de planta y mayor número de hojas al tratamiento conformado por la concentración de 0,1mg/l de ANA (Ácido Naftalenacético), y 2,5mg/l de BAP (6-Benzil amino-purina), dando como promedio una altura de de vitroplanta de 40,34 mm. Con un número de 8 hojas en promedio. Así mismo el porcentaje de brotación es de 85,56%, porcentaje de sobrevivencia 88,89%, porcentaje de contaminación 15,56% y porcentaje de oxidación 31,11%.

## SUMMARY

The present research work entitled evaluation of three levels of auxins and cytokinins to obtain plant mother of Rosa (*Rosa* sp.) variety Freedom conditions in vitro was performed at the Faculty of Agronomy-UMSA, where the objectives were: to assess the development of explants of Rosa (*Rosa* sp.) variety Freedom in the culture medium established, assessing the risk of contamination and oxidation in the phase of establishment of the cultivation of Rosa (*Rosa* sp.) variety Freedom, finding optimal concentration of auxins and cytokinins to the establishment of Rosa (*Rosa* sp.) of the variety Freedom in invitro conditions, where it was used as plant material to introduce lateral buds of Rosa (pink sp.). The treatments were distributed in a completely randomized design with bivariate, arranged with nine treatments and ten replications, where each treatment was conformed by different levels of concentration of BAP (6-benzyl furan) ANA (naftalenacético acid). Where it is determined with greater plant height and greater number of leaves made of treatment by the concentration of 0, 1 mg/l of ANA (naftalenacético acid), and 2, 5 mg/l BAP (6-benzyl furan), giving an average a height of from 40,34 mm vitroplanta With a number of 8 sheets in averaged. Same way sprouting percentage is 85,56% percentage of survival 88,89%, percentage of pollution 15.56% and percentage of oxidation 31.11%.

## 1. INTRODUCCIÓN

La rosa es una planta de gran interés comercial, actualmente es una de las flores más conocidas y cultivada como flor cortada debido a su insuperable belleza, la amplia variedad de colores y combinaciones llegan a tener una gran demanda.

El principal problema del cultivo de rosas en nuestro medio, es la obtención de plantas de alta calidad que estén libres de plagas y enfermedades, y por esta razón el agricultor opta por importar rosas de otros países encareciendo sus costos de producción.

La rosa se propaga por vía asexual y sexual. Actualmente la forma de propagación más utilizada es asexualmente a través de esquejes, acodos y estacas y micropropagación in vitro.

Esta última plantea una serie de ventajas, como es la alta eficiencia de multiplicación de individuos superiores libres de patógenos, pues a partir de explantes o porciones de tejidos se obtiene una descendencia masiva que genera una gran cantidad de plantas completas con alta calidad fitosanitaria. La producción de rosa en nuestro país actualmente a obtenido una gran importancia económica debido a la gran demanda de flor de corte que plantean los mercados.

Por lo tanto la utilización de la micropropagación in vitro favorece con varias ventajas como es la alta tasa de multiplicación donde a partir de una muestra de tejido como son yemas apicales y laterales, se llegan a obtener una gran cantidad de vitroplantas.

El presente trabajo tiene como propósito obtener el medio de cultivo óptimo para lograr el establecimiento del cultivo de rosa en condiciones in vitro con la finalidad de generar plantas madres que se encuentren libres de patógenos y enfermedades.

## 1.1. Antecedentes

Portillo (1999), indica que la micro propagación in vitro desde sus inicios plantea una serie de ventajas, como lo es la alta eficiencia en la multiplicación de individuos superiores libres de patógenos

Medina (2005), señala que una alternativa para la propagación de rosa es la micropropagación que consiste en tomar células o tejidos de la planta preferiblemente de origen meristemático, por tanto la micropropagación permite la reproducción de miles de plantas por metro cuadrado y tienen la ventaja de que si el ejemplar parental está sano, todas las plantas que se originen a partir de él, son sanas.

Margara (1988), indica que es necesario uno o más sustancias reguladoras de crecimiento, frecuentemente auxinas y/o citoquininas, pero a veces también giberelinas, ácido abscisico o etileno para mejorar el desarrollo del cultivo in vitro de tejidos y órganos.

Murashige Skoog (1962), menciona que la iniciación de raíces y brotes en las plantas, se encuentran reguladas básicamente por la interacción entre auxinas y citoquininas, a si una relación de auxina-citoquinina menor a uno favorece la brotación, mientras que si es mayor a uno se induce el enraizamiento de los explantes.

De acuerdo a lo que indican Mangara y Murashige Skoog la interacción entres hormonas de crecimiento principalmente auxinas y citoquininas ayudan al desarrollo de los explantes en condiciones in vitro, por la misma razón se llega a realizar el trabajo de investigación usando reguladores de crecimiento para un mejor desarrollo y crecimiento de vitroplantas de Rosa (*Rosa sp.*) variedad Freedom.

Weld (2008), señala que se llegaron a alcanzar porcentajes altos de sobrevivencia en la fase de establecimiento en rosas usando el medio de cultivo MS y concentraciones hormonales de AIA y BAP.

Usando auxinas y citoquininas en el medio de cultivo dan resultados óptimos en el desarrollo de Rosas, de acuerdo a lo señalado por Weld se llegan a tener porcentajes altos de sobrevivencia en la fase de establecimiento, lo cual apoya a la investigación donde se usan concentraciones de BAP (citoquinina) y ANA (auxina).

Pérez (1998), indica que un balance adecuado entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo es necesario para la para la formación de plantas a partir de meristemos, ápices o yemas. Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante. Algunas especies son cultivadas sin adición de ningún regulador externo probablemente debido a que exista suficiente cantidad endógena de hormonas.

Siguiendo el criterio de Pérez se debe tomar en cuenta el balance entre reguladores de crecimiento, usando niveles de concentraciones recomendados en investigaciones que dieron óptimos resultados y respetando los parámetros dados para el uso de cada regulador de crecimiento.

Hu y Wang (1983), reportan que el 85% de los medios de establecimiento se utilizan citoquininas, las más empleadas han sido las 6 Benzilaminopurina (6 BAP) (68%), la kinetina (23%) y el 2ip y zeatina (9%).

## **1.2. Justificación**

La rosa es apreciada como flor de corte debido a que es una especie con una amplia demanda en el mercado interno y externo.

Actualmente el cultivo de rosas se realiza en campo e invernadero usando los métodos de propagación tradicionales como ser esquejes y estacas, con estos métodos se llegan a obtener plantas con baja calidad de flor y baja calidad fitosanitaria, que se debe principalmente al ataque constante de plagas y enfermedades (Quiroz, 2014).

Otro de los problemas frecuentes que se presenta en el cultivo de Rosa (*Rosa* sp.) es la dificultad de enraizamiento que se presenta principalmente en variedades híbridas como ser la variedad Freedom y la variedad Samantha (Alvarado, 2010).

Por estos problemas mencionados el productor no llega a cubrir la demanda, ni las exigencias del mercado, por tanto opta por importar rosas de otros países presentando mejor calidad floral, de esta manera llegan a satisfacer las exigencias y demandas del mercado interno, por tanto se plantea el cultivo in vitro como una alternativa para la propagación de rosas, donde las técnicas de cultivo de tejidos ofrecen muchas facilidades para la producción intensiva de material vegetal, libre de enfermedades sistémicas y no sistémicas. Asegurando así una homogeneidad en la producción y alta calidad de flor ya que de estos factores depende la aceptación del mercado.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General**

- Evaluación de tres niveles de auxinas y citoquininas para la obtención de plantas madre de Rosa de la variedad Freedom en condiciones in vitro.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Evaluar el desarrollo de explantes de Rosa variedad Freedom, en el medio de cultivo establecido.

- Evaluar la contaminación y oxidación en la fase de establecimiento de Rosa (*Rosa* sp.) variedad Freedom.
- Encontrar la concentración óptima de auxinas y citoquininas para el establecimiento de la Rosa variedad Freedom en condiciones in vitro.

### **3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Características Botánicas del Cultivo de Rosas**

Rojas (2003), menciona que las rosas son Plantas leñosas o arbustivas o herbáceas de hojas simples o compuestas, estipuladas, alternas. Inflorescencias racimosas de diversas formas, con flores actinomorfas hermafroditas.

Aalsmeer (2003), indica que las rosas son arbustos leñosos compuestos que brotan en disposición espiral sobre los tallos con respecto a la flor principal; los brotes y tallos generalmente tienen algunas hojas labiales en la base. Los grupos más importantes son las rosas de flor grande o híbridos de té (Tea- hybrids) con una o más flores por tallo, las polyantha con ramilletes de muchas flores pequeñas, los híbridos floribunda y glandiflora, con un número de flores intermedio entre aquellas de los dos grupos anteriores.

Las variedades pueden distinguirse por su color, la forma del cálamo, posición de los sépalos, la forma de los pétalos, del botón y de la flor abierta. En la mayoría de las especies de rosa las flores tienen cinco sépalos y treinta pétalos pero actualmente se han desarrollado variedades con muchos más pétalos.

Produce (s.f), indica que la rosa es un arbusto leñoso es caducifolia, por lo que tiene un periodo de dormancia.

En la actualidad se divide en tres tipos:

- De flor grande (hibrido de te).
- Sweet hearts(pequeñas).
- Spray(en ramillete) los cuales se dividen en:
  - i. Híbridos de te
  - ii. Freedom (rojo)
  - iii. Black magic (rojo)
  - iv. Romeo (rojo)

### **3.1.1 Usos**

La rosa es una flor ornamentales gran utilidad en jardines por su vistosidad y decoración muy comercializada en el mercado de flores y floristerías, tanto la rosa como otras ornamentales son cultivadas en jardines o invernaderos en diversas formas y se ha especializado en los mercados nacionales e internacionales como flor de corte. La Rosa también se encuentra dentro de las farmacopeas Europeas ya que tanto su parte floral la usan para aceites, fragancias y son utilizadas en la industria farmacéutica (Quiroz, 2010).

### **3.1.2 Características de la Rosa variedad Freedom**

Su flor es de color rojo de botón grande, seleccionada para ambientes frescos con alta intensidad de luz, especialmente Sur y Centro América, las flores tiene una larga vida en florero y se transporta muy bien, ya sea empacada en seco o hidratada, por sus características es ideal para los mercados Americanos, Europeos, Rusos y Nacionales (Rosen,2005).

- Variedad: Freedom
- Código: 97544
- Obtentor: Rosen Tantau

- Color: Rojo
- Productividad: 1,2 tallos planta/ mes
- Número de pétalos: 30-35
- Tamaño del botón: 5,5-6,5 cm
- Tendencias de longitud: 50- 80 cm
- Vida en florero: 14-17 días

### **3.2 Macropropagación**

Sabja (1980), menciona que la macropropagación es un sistema de propagación de bajo costo, ya que el material generalmente se saca a partir de ramas obtenidos por podas, esto hace que se obtenga una gran cantidad de nuevas plantas y guarden las mismas características y calidad de la planta madre.

#### **3.2.1 Acodos**

Hatmant et al., (2002), este método de propagación vegetativa provoca la formación de raíces adventicias en un tallo que está todavía adherido a la planta madre, el cual posteriormente es separado, convirtiéndose en una nueva planta que crecerá con sus propias raíces.

#### **3.2.2 Injertos de Yemas**

Multiplicar rosas por injerto consiste sencillamente en tomar una yema de una variedad e injertarla sobre un rosa silvestre que actúa como patrón o porta injerto. Los sistemas comúnmente utilizados son de escudete y el injerto sobre la raíz. Los patrones más usados son *Rosa canina*, *Rosa eglanteria* o el híbrido 'Manetti'. De esta yema que se injertó saldrá un brote que dará lugar a la copa (ramas, hojas y flores). Esta es la forma que utilizan los viveros comerciales de rosales ornamentales (Fuchs, 1950).

### **3.2.3 Estacas**

Sabja (1980), indica que en la propagación por estacas, se corta de la planta madre una porción de tallo o rama, después de lo cual, esa porción se coloca en condiciones ambientales favorables y se induce a que forme raíces y tallos, obteniéndose con ello, una planta nueva e independiente. En aquellas especies, que se pueden propagar con facilidad por estacas, este método tiene numerosas ventajas, como son, el que a partir de unas cuantas plantas madres, sea posible iniciar muchas nuevas plantas, en un espacio limitado; es económico, rápido y simple ya que no requiere técnicas especiales y finalmente, la planta madre, por lo general, se reproduce exactamente sin cambio genético en la descendencia.

### **3.3 Generalidades del Cultivo In Vitro**

Pérez (1998), los orígenes del cultivo in vitro se remontan a 1902 con los intentos realizados por Haberland de cultivar células aisladas de plantas, quien postulo el principio de la totipotencia celular, que es la base teórica sobre la que se sustentan todas la técnicas del cultivo in vitro.

El cultivo in vitro, es el conjunto de técnicas y metodologías que permiten el cultivo de partes de una planta tales como órganos, tejidos, células o simplemente protoplastos en un recipiente que contienen sustancias nutritivas en condiciones estériles y en un ambiente controlado. Esta técnica aprovecha la totipotencia de las células vegetales, ósea la capacidad de reproducir órganos con retoños y/o raíces, organogénesis en un medio de cultivo favorable en un recipiente (Mendoza, 1994; citado por Villalaba, 2003).

Pérez (1998), los orígenes del cultivo in vitro se remontan a 1902 con los intentos realizados por Haberland de cultivar células aisladas de plantas, quien postulo el principio de la totipotencia celular, que es la base teórica sobre la que se sustentan todas la técnicas del cultivo in vitro.

In vitro significa sencillamente “en vidrio”, porque durante las primeras etapas del proceso las plantas crecen en tubos de ensayo y matraces. Esta técnica se basa en la “totipotencia celular, la capacidad de una célula vegetal de formar una planta completa, bajo condiciones dadas en el cultivo in vitro (Hewstone y Reyes, 2011).

Vasil (1994), indica que a partir de los avances alcanzados en la regeneración de las plantas in vitro se ha desarrollado toda una industria de micropropagación, que se inició por los países desarrollados de Europa y Estados Unidos y que en la actualidad se ha extendido al resto del mundo incluyendo a países de América Latina, Asia y África. Esta industria está compuesta por cerca de 600 compañías en el mundo con una producción de más de 500 millones de unidades por año.

Pérez (1998), El cultivo de tejidos puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales.

El término cultivo in vitro es considerado “cultivo de tejidos” siendo una herramienta de la biotecnología que permite el uso de un conjunto de técnicas que establecen el cultivo en condiciones asépticas usando como material de partida: órganos, tejidos, células, etc., empleando medios nutritivos artificiales (Espinoza, 2013).

Según Murillo (2014), el término genérico “cultivo de tejidos vegetales” involucra a diferentes técnicas de cultivo de material vegetal diverso, incluyendo a los protoplastos (células desprovistas de su pared celular), células, tejidos, órganos y plantas completas. Mediante estas y otras técnicas de cultivo, es posible obtener plantas libres de microorganismos en un medio nutritivo aséptico (estéril) en condiciones ambientales controladas.

### **3.4 Métodos de Regeneración de Plantas**

#### **3.4.1 Organogénesis**

La organogénesis es un evento morfogénético que se caracteriza por su desarrollo unipolar, en otras palabras, es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de este en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía formación de primordios de raíces y el subsecuente enrizamiento final. Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos. En contraste con la embriogénesis somática, en la vía organogénica para lograr la formación de una planta completa, ya sea por la vía directa o indirecta, se requiere de una secuencia de medios de cultivo, ya que aquellos medios que favorecen en el desarrollo de los brotes inhiben la formación de raíces y viceversa.

Espinoza (2013), indica este método fue uno de los primeros en ponerse en práctica, consiste en emplear explantes provenientes de raíces, tallos, hojas, embriones, anteras, meristemas y otros. Entre los mencionados el cultivo de anteras, embriones y de meristemas son muy importantes porque tienen una utilización frecuente en la propagación y mejoramiento genético.

Cuando un órgano es cultivado en medios de cultivo llamado también medios sintéticos, el crecimiento y desarrollo puede continuar de manera semejante a la que tenía en la planta madre o cambiar totalmente, por ejemplo un embrión aislado de una semilla e inoculado en medio sintético puede crecer y desarrollarse armónicamente hasta formar una planta completa; sin embargo dependiendo de los reguladores de crecimiento presentes en el medio de cultivo se pueden favorecer el desarrollo solo de los primordios foliares o radiculares del embrión, existiendo un desarrollo desproporcionado en una de las dos partes, es posible

también que los reguladores de crecimiento en los medios de cultivo puede inducir la formación de callos , meristemas, apical y yemas (Espinoza,2013).

**a) Formación de Yemas Axilares.** Esta técnica se basa en la formación de brotes a partir de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas o primordios de hojas, los cuales son divididos y subcultivados repetidamente (Hu y Wang, 1983),

Murillo (2014), entre los métodos para lograr la multiplicación de propagalos in vitro, la proliferación de yemas axilares posibilita la estabilidad genética en las plantas producidas y puede ser fácilmente establecida en la mayoría de las especies. Es el método que mayor popularidad ha alcanzado en los últimos años.

Según Takayama y Akita (1996), Este método a pesar de no ser el más rápido, ha sido el más utilizado para la propagación comercial debido en primer lugar a la facilidad con que se ha establecido en la mayoría de las especies y en segundo lugar a la estabilidad genética de las plantas regeneradas, siendo el sistema de regeneración en el cual se reportan los menores índices de variación genética. Su principal desventaja radica en la laboriosidad del proceso, lo cual implica altos costos por mano de obra, bajos coeficientes de multiplicación en comparación con otros sistemas de regeneración y escasa posibilidad de automatización del proceso productivo. No obstante, existen posibilidades de automatizar algunas etapas del proceso con la utilización de bioreactores.

**b) Formación de Yemas Adventicias.** Con esta técnica es posible producir un mayor número de plantas por unidad de tiempo en comparación con el método de yemas axilares y a la vez presenta mayores posibilidades de mecanización-automatización, existiendo ya varios ejemplos de utilización de birreactores para su producción (Akita y Col, 1994).

Sin embargo, al igual que el método de yemas axilares tiene la limitante de que el proceso productivo es realizado en dos etapas: producción de brotes y crecimiento-

enraizamiento. Adicionalmente presenta el inconveniente de que puede ser una fuente de variación genética debido al propio origen unicelular de las yemas adventicias (Reuveni y Col, 1985).

### **3.4.2 Embriogénesis Somática**

Se ha definido como embriones somáticos, asexuales o adventicios los iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos (Tisserat, 1979).

Según Litz y Jarret (1991), los embriones somáticos son estructuras bipolares, que tienen un eje apical radical, aislados por un tejido epidérmico y no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras bipolares deben ser capaces de crecer y formar plantas normales.

Este método es ampliamente considerado como el más eficiente para la producción masiva de plantas in vitro, debido a la naturaleza bipolar del embrión y la facilidad con que puede ser automatizado todo el proceso productivo (Preil, 1991).

Redenbaugh (1986), indica que los altos coeficientes de multiplicación en cortos periodos de tiempo y la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales.

Su desventajas radican en el desconocimiento que existe sobre la biología del proceso, siendo limitado el número de especies en los cuales se reporta una embriogénesis somática eficiente que permite un uso aplicado del método aun cuando se reporta la embriogénesis somática en un número relativamente alto de especies ; destacándose la zanahoria la alfalfa y el apio por su elevada capacidad embriogénica , así como por el número de investigaciones realizadas y por los éxitos obtenidos en el aumento de la eficiencia de la embriogénesis, encaminados a la producción de semilla artificial y a la multiplicación masiva en medios líquidos empleando bioreactores (Renbaugh,1986).

### **3.5 Aplicaciones del Cultivo de Tejidos**

#### **3.5.1 Obtención de Plantas Libres de Patógenos**

Pudiera decirse que esta fue la primera aplicación práctica de las técnicas de cultivo in vitro. Desde la demostración de que mediante el cultivo de meristemos podían aislarse zonas de tejidos que escaparan a la infección viral y la posibilidad de regenerar plantas libres de virus a partir de estos (Morel y Martin, 1955).

La obtención de plantas libres de patógenos es la base de la propagación masiva de plantas, pues con el mismo se puede multiplicar rápidamente el material de siembra, existe el peligro de la diseminación acelerada de microorganismos Fitopatógenos junto con este (Pérez, 1998).

Es por esta razón que debe asegurarse la completa sanidad de los explantes iniciales, para lo cual la estrategia más sencilla consiste en tomar los explantes de plantas previamente diagnosticadas como libre de enfermedades; pero para realizar esto es necesario contar con sistemas de diagnóstico suficientemente seguros (Hernández, 1997; citado por Murillo 2014).

Sin embargo, no siempre es posible contar con plantas saneadas y entonces es necesario recurrir a un grupo de técnicas para el saneamiento. Entre las técnicas que se utilizan están el cultivo de meristemos, la termoterapia, a quimioterapia y más recientemente la electroterapia (Hernández, 1995).

#### **3.5.2 Propagación Masiva**

La propagación de plantas es sin duda la más popular de las aplicaciones del cultivo in vitro, sus bases fueron establecidas desde los años 50 y 60 y fue realmente en las décadas del 70 y 80 que se estableció una verdadera industria de micropropagación (Kitto, 1997).

Pérez (1998), menciona las principales ventajas de este sistema de propagación se pueden resumir en:

- Altos coeficientes de multiplicación que permiten manipular volúmenes elevados de plantas en cortos periodos de tiempo.
- Introducción rápida de nuevas variedades o clones.
- Producción independiente de las condiciones ambientales.
- Incremento en los rendimientos debido al rejuvenecimiento y al saneamiento.
- Uniformidad en las plantas producidas.
- Mayor facilidad en la comercialización.

La formación de brotes a partir de ápices yemas o meristemas y la subsecuente regeneración de plantas es el sistema más sencillo de multiplicación in vitro y son más de miles las especies en las cuales se ha logrado establecer esta técnica (Murashige y Huang, 1987; citado por Murillo, 2014).

### **3.5.3 Conservación de Germoplasma**

El mantenimiento de bancos de germoplasma es una necesidad para los programas de mejoramiento genético cuando este sea necesario. El cultivo in vitro ofrece una serie de ventajas para la conservación tales como el reducido espacio necesario para almacenar un gran número de genotipos , el material puede ser saneado de patógenos y mantenido libre de estos, siendo posible multiplicar rápidamente cuando es necesario, lo que permite disponer de las plantas en el momento deseado (Kantha, 1981).

### **3.6 Micropropagación**

Se entiende por micropropagación a cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación en plantas, de órganos tejidos o células que produzcan

poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente (Murillo, 2014).

Según Medina (2005), la micropropagación consiste en tomar células o tejidos de la planta, preferiblemente de origen meristemático, que se encuentran en las yemas. Lo que se hace en el laboratorio es programar esas células para que formen tallos, luego se multiplican esos tallos y se aplica un programa de enraizado, es decir, se cambian las condiciones hormonales para que forme raíz. Una vez que la planta está completa y que puede absorber nutrientes por raíz, se lleva a un invernadero.

Carrillo (2004), señala que esta técnica se usa para propagar plantas a partir de plantas madres por lo que las plántulas obtenidas son idénticas a la planta madre.

Hartmann y Hudson (1997), indican que la propagación mediante cultivo in vitro se caracteriza por las tasas potencialmente altas para multiplicación de clones que pueden lograrse en un tiempo relativamente corto las tasas teóricas mencionan que de una plantita multiplicada geométricamente se puede predecir llegar a un millón plantitas en 6 meses (con una tasa de 10 cultivos mensuales). Pero en la práctica se ha obtenido de 1 a 3 millones de plantas de helecho, fresa, lirio y orquídeas.

La micropropagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. El cultivo es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tiene las células vegetales; esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados (INTA, 2010).

Espinoza (2013), menciona que la propagación in vitro, también denominada micropropagación, es la aplicación más completa de cultivo de tejidos, de mayor impacto y más ampliamente utilizado en todos los laboratorios de biotecnología vegetal. Consiste en producir plantas conformes a la planta madre por las estimulaciones de capacidades naturales de multiplicación vegetativa de la especie por la inducción de una nueva organogénesis de brotes y raíces. La micropropagación aplicación en la multiplicación rápida de variedades nuevas o introducidas recientemente, o en aquellas especies que tienen un bajo porcentaje de reproducción, también es usado ampliamente en programas de mejoramiento genético.

### **3.6.1 Ventajas de la Micropropagación**

Murillo (2014), señal las siguientes ventajas que presenta la micropropagación in vitro:

**a) Mayor rapidez en la introducción de productos.** La micropropagación puede introducir un producto en el mercado más rápidamente que los métodos comerciales: selección individual de las plantas elites, altos coeficientes de propagación, uniformidad en las plantas producidas, elevada producción en espacios reducidos.

**b) Mayor calidad del producto.** El valor del producto se incrementa como consecuencia de: plantas libres de enfermedades, mejoramiento del fenotipo de las plantas.

**c) Mayor facilidad en la comercialización.** La comercialización de las plantas micro propagadas se facilita debido a: flexibilidad en la forma del producto, facilidades en la transportación y embarque, producción durante todo el año.

### **3.6.2 Factores Limitantes de la Micropropagación**

**a) Costo de producción relativamente alto.** La micropropagación a un requiere un alto componente de mano de obra altamente calificada. Por tanto los costos en muchas especies son más altos que los métodos convencionales como la producción de esquejes y la propagación por semillas. La mano de obra puede representar hasta un 70% del costo final, la producción en países con mano de obra más barata es solo una solución temporal, se necesita métodos con costos reducidos.

**b) Aparición de plantas fuera de tipo.** Aun cuando la micropropagación es una tecnología de clonación, pueden ocurrir mutaciones durante las distintas etapas del proceso, aunque la variabilidad es siempre un riesgo en este método.

**c) No es aplicable a todos los cultivos.** No todos los cultivos pueden ser comercialmente propagados por micropropagación a los niveles actuales de esta tecnología. Aunque existen muchos reportes científicos en un variado número de especies, estos aún no están listos para su aplicación a escala comercial y en otros cultivos ningún sistema de regeneración ha sido desarrollado hasta el momento, lo cual limita la aplicación de esta tecnología.

### **3.7 Fases de la Micropropagación**

#### **3.7.1 Fase 0 Selección de Materiales Vegetales**

Espinoza (2013), menciona que esta fase es de suma importancia para garantizar el éxito del proceso de micropropagación, en esta etapa se selecciona el material vegetal que se utiliza como material de partida o fuente de explante. Debe provenir de plantas sanas y vigorosas, escogiendo aquellas plantas que se destaquen en la población a fin de garantizar la propagación de un material con la mayor calidad desde el punto de vista genético y sanitario.

Inicialmente, esta fase fue concebida para tratar de reducir los problemas de contaminación que presentan comúnmente en la Fase I (Debergh y Maene, 1981).

Sin embargo en la actualidad existe un consenso de que esta etapa es importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de micropropagación eficiente y repetible, por lo que cada vez se la va prestando mayor importancia. Tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso tanto desde el punto de vista sanitario, fisiológico como genético (Pérez ,1998; citado por Murillo, 2014).

La iniciación de un proceso de micropropagación solo tiene sentido cuando se emplea un material adecuado. La constitución genética de la planta es el primer factor relacionado con la frecuencia de variantes somaclonales resultante del proceso de propagación (Evans y Bravo, 1985).

Pérez (1998), indica que en plantas ornamentales es común que la selección se realice sobre plantas micropropagadas las cuales son cultivadas en condiciones controladas (invernaderos) o áreas aisladas, lo cual evita una serie de riesgos, facilita la reimplantación in vitro y además mejora el proceso de selección. El estado fisiológico de la planta que dona el explante es de gran influencia en la respuesta de los tejidos en cultivo, reportándose diferencias en los requerimientos nutricionales y hormonales cuando los tejidos provienen de plantas con diferentes edades fisiológicas. Generalmente se utilizan plantas en estado de crecimiento activo que muestran un desarrollo vigoroso y sano.

### **3.7.2 Fase I Establecimiento**

El objetivo de esta etapa es lograr el establecimiento de cultivos axénicos y fisiológicamente vigorosos con los cuales iniciar el proceso de multiplicación (Pérez, 1998).

Los explantes tomados de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo. A medida que es más joven y menos diferenciado el tejido que se va implantar, mejor será la respuesta in vitro.

El tamaño del explante es un factor importante que influye en la desinfección y regeneración de las plantas, a medida que el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración, mientras que con el aumento del explante es mayor el peligro de contaminación y más rápido el crecimiento y la regeneración de plantas (Villalobos y Garcia, 1982).

Es posible utilizar una gran variedad de explantes para iniciar los cultivos in vitro, sin embargo para los fines de propagación comercial se emplean generalmente meristemas o ápices. La utilización de uno u otro tipo de explante depende de los objetivos de la propagación, si el objetivo es plantas libres de virus o enfermedades sistémicas es necesario la utilización de meristemas, pero si por el contrario el objetivo es solamente la multiplicación de semilla y no hay peligro de diseminación de enfermedades o se parte de plantas diagnosticadas, es frecuente el empleo de ápices caulinares debido a que la manipulación y la regeneración de plantas es más fácil (Villalobos y García, 1982).

El objetivo de esta fase es obtener un cultivo aséptico de la especie que se requiere multiplicar, el establecimiento incluye la desinfección y siembra del explante en condiciones asépticas en medios de cultivo, esta fase termina con la obtención de un cultivo libre de contaminación visibles y suficientemente adaptadas a las condiciones in vitro (Espinoza, 2013).

### **3.7.3 Fase II Multiplicación**

Como su nombre indica, el objetivo de esta fase es la producción del mayor número posible de propágulos a partir de brotes establecidos los cuales son

separados en condiciones estériles y cultivadas nuevamente en medio fresco para inducir nuevos brotes operación que se repite hasta lograr la cantidad de plantas deseadas (Murillo, 2014).

#### **3.7.4 Fase III Enraizamiento**

En esta fase los brotes obtenidos durante la etapa de multiplicación crecen hasta formar plantas completas y desarrollan un sistema radicular que les permite ser trasplantadas a un sustrato, pero no siempre esta fase es llevada a condiciones *in vitro*, existe la posibilidad de hacerlo en recipientes con sustratos en condiciones de laboratorio, sumergiendo los brotes antes de trasplantar en una solución enraizadora (Espinoza, 2013).

#### **3.7.5 Fase IV Aclimatación**

Los objetivos primarios de la fase de aclimatación son: lograr la supervivencia de las plantas al momento de trasplante y el crecimiento de las mismas hasta alcanzar un desarrollo que le permite ser trasplantadas a campo abierto. Durante esta etapa se produce un retorno gradual de las plantas a sus características morfológicas normales, después de esta etapa *in vitro*. La eficiencia en la aclimatación es trascendental para la propagación comercial, pues del resultado de esta dependerá en gran medida la eficiencia total del proceso y la calidad final de plantas (Murillo, 2014).

### **3.8 Cultivo de Meristemos**

Penacho *et al.*, (2007), indica que el cultivo de meristemos es el cultivo *in vitro* del domo apical como una media que mide 100 x 100  $\mu\text{m}$  más los primordios foliares.

González (2007) y Rodríguez (2000), los meristemos, son tejidos embrionarios que persisten en la planta durante toda su vida. Los mismos, son los responsables de

su crecimiento permanente, gracias a su capacidad de sufrir mitosis y diferenciación; sus células son pequeñas, tienen forma poliédrica, paredes finas y vacuolas pequeñas y abundantes; además, de estas células aparecen los demás tejidos.

Carrillo (2004), señala que existen cinco tipos de meristemos, de acuerdo a su posición topográfica en las plantas, los cuales se describen a continuación:

**a) Meristemos apicales:** localizados en el ápice de los órganos (tallos, raíces, glándulas, etc.).

**b) Meristemos basales:** localizados en la base de los órganos (espinas).

**c) Meristemos intercalares:** situados entre células diferenciadas (maduras), contribuyendo al crecimiento en ambos lados.

**d) Meristemos laterales:** localizados en la periferia de los órganos, favoreciendo el crecimiento en grosor.

**e) Meristemos axilares:** son los meristemos apicales de las yemas, situados en las axilas de las hojas.

El cultivo de meristemos tiene numerosas aplicaciones. Una de ellas la más importante es la obtención de plantas libres de virus, ya que esta pequeña zona de tejido generalmente no es afectada por estos patógenos vegetales. Otra muy importante es la multiplicación vegetal. La técnica permite también multiplicar especies de plantas con reproducción lenta o dificultosa (como las orquídeas), o acelerar la producción de plantas bienales (Segretin, 2006).

### **3.9 Explante**

Moya (2001), menciona que el explante se refiere a cualquier parte vegetal que ha sido separada de la planta, que puede ser un tejido (fragmento de hojas, tallos, raíces completas, etc.), estructuras como las anteras y los ovarios, o bien células individuales (como en el caso de los protoplastos). Con excepción de los óvulos y el polen, los explantes están constituidos por tejidos y/o células somáticos. Los explantes tomados de plantas jóvenes o de zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo. A medida que es más joven y menos diferenciado del tejido que se va implantar, mejor será la respuesta in vitro.

El tamaño del explante es un factor importante que influye en la desinfección y regeneración de las plantas, a medida que el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración, mientras que con el aumento del tamaño del explante es mayor el peligro de contaminación y más rápido el crecimiento y la regeneración de la planta (Villalobos y García, 1982).

Murillo (2014), indica que la selección de un adecuado explante inicial determina mejores resultados en la regeneración o formación de las plantas in vitro. La sección de tejido utilizada varía en dependencia de las características morfológicas de las diferentes especies, como regla general, se toma las yemas del tallo principal y de los brotes axilares de las plantas.

### **3.10 Oxidación Fenólica**

Pérez (1998), las oxidaciones fenólicas pueden ocasionar un serio problema en el establecimiento y supervivencia de meristemos y ápices, las cuales se manifiestan como un ennegrecimiento del medio de cultivo por la zona cercana al explante y puede extenderse a todo el medio produciendo una seria afección en el crecimiento del explante, al que puede provocar la muerte. Este fenómeno es

más agudo en las especies leñosas, aunque es reportado en amplio rango de vegetales, constituyendo en múltiples ocasiones una dificultad para el establecimiento de los cultivos *in vitro*.

Cuando los tejidos son dañados, por ejemplo durante la preparación del explante, los compuestos fenólicos que están acumulados en grandes cantidades en las vacuolas se mezclan con el contenido de los plastidios y otros organelos donde están confinadas las polifenoloxidasas y aparece la coloración negra o marrón como consecuencia del proceso de oxidación (Preece y Compton, 1991).

Pérez (1998), en general los fenoles son productos extremadamente lábiles que se oxidan con gran facilidad. Estos productos oxidados pueden ser fitotóxicos y a la vez pueden incrementar los procesos de oxidación, debido a que después de oxidados se convierten a la vez en fuertes agentes oxidantes.

### **3.11 Medios de Cultivo**

Espinoza (2013), se da el nombre de medio de cultivo al sustrato artificial de composición completa, utilizado para el crecimiento y desarrollo de las vitroplantas.

Según González (2003), el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) para el normal desarrollo de una planta se ha empleado de una manera muy general para todos los tipos de cultivo "*in vitro*". Además, puede afirmarse que ha sido la utilización del medio MS, junto con el empleo de fitohormonas apropiadas (citoquininas y auxinas), lo que ha permitido el éxito de los trabajos sobre organogénesis en cultivo "*in vitro*".

Para el cultivo de meristemas y ápices no existe un medio universal, sin embargo el medio basal propuesto por Murashige y Skoog (1962) con algunas modificaciones en sus ingredientes ha sido el más frecuentemente utilizado, reportándose su utilización en la mayoría de las especies propagadas *in vitro* (Kantha, 1981).

Hurtado y Merino (1994), indica que el éxito que se obtenga en cultivos vegetales dependerá del uso del medio adecuado, empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivos, etc. Usando las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas donde los medios de cultivo se componen de los siguientes ingredientes: sales inorgánicas, compuestos orgánicos, complejos naturales y materiales inertes de soporte.

El medio de cultivo permite de forma artificial y bajo condiciones estériles puedan vivir y multiplicarse células, tejidos y órganos separados del tejido que les dio origen. Los medios de cultivo contienen macronutrientes, micronutrientes, además de carbohidratos, usualmente la sacarosa puede reemplazar el carbono que la planta normalmente fija en la atmosfera por medio de la fotosíntesis y compuestos orgánicos en pequeñas cantidades como vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento (Espinoza, 2013).

### **3.12 Composición del Medio de Cultivo**

Los medios de cultivo deben ser preparados con sumo cuidado, ya que los diversos productos que los conforman intervienen en cantidades pequeñas. Un adecuado medio de cultivo debe tener sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, aminoácidos y otros elementos inorgánicos los que varían ampliamente respecto a su composición y concentración. Los ingredientes del medio de cultivo se pueden clasificar en: sales inorgánicas, compuestos orgánicos, complejos naturales y materiales inertes de soporte (Murillo, 2014).

#### **3.12.1 Sales Inorgánicas**

Se dividen en macro y micro nutrientes, esta división se basa en la cantidad que absorben las plantas ciertos elementos: calcio, magnesio, potasio, nitrógeno, fosforo y azufre son requeridos por las plantas en grandes cantidades (g/l) y se les llama macronutrientes. Otros como el hierro, magnesio, boro, cobre, zinc,

molibdeno y cloro, se requieren en pequeñas cantidades (mg/l o ppm) y se llama elementos traza o micronutrientes (Barba, 2001).

Murillo (2014), para un rápido y vigoroso crecimiento, las plantas necesitan tomar del medio de cultivo cantidades relativamente grandes de algunos iones inorgánicos llamados macronutrientes y cantidades pequeñas o traza de otros llamados micronutrientes.

### **3.12.2 Compuestos Orgánicos**

Los compuestos orgánicos se clasifican en cuatro grupos importantes: carbohidratos o fuentes de energía, sustancias hormonales, vitaminas y aminoácidos (Espinoza, 2013).

Hurtado y Merino (1962), indican que se clasifican en tres grupos: carbohidratos, sustancias hormonales y vitaminas. Frecuentemente se ha obtenido buenos resultados cuando se emplean también ciertos aminoácidos y /o amidas, algunas purinas, pirimidinas, hexitoles y ácidos orgánicos.

### **3.12.3 Fuentes de carbono**

La sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente utilizada y se emplea a una concentración de 2-4%. Ocasionalmente se utilizan otros carbohidratos como la glucosa en cultivos de monocotiledóneas, así como la fructosa, almidón, lactosa, maltosa, sorbitol, manitol y galactosa en otras especies; pero esos compuestos son inferiores a la sacarosa como fuente de carbono. La sacarosa puede ser sustituida por azúcar refinada que también genera óptimos resultados (Murillo, 2014).

Según Espinoza (2013), el compuesto más usado como fuente de energía es la sacarosa considerada esencial en los medios de cultivo, se puede usar también otros carbohidratos como la glucosa, fructosa, lactosa, sorbitol y el azúcar común,

es recomendable usar azúcar morena porque mientras menos procesada sea el carbohidrato menos contaminación existe en los medios de cultivo.

### **3.12.4 Reguladores de Crecimiento**

Hurtado y Merino (1994), señala que los principales reguladores de crecimiento son las auxinas, citoquininas y giberilinas las mismas se describen a continuación.

**3.12.4.1 Auxinas.** Soberón *et al.*, (2005), afirma que las auxinas promueven el crecimiento en tallos, causan la formación de raíces adventicias, inhiben el crecimiento en raíces en concentraciones bajas. Promueven la dominancia apical, favorecen la floración, inducen la diferenciación vascular, retardan la abscisión de hojas, flores y frutos jóvenes, estimulan la formación de raíces adventicias de tallos y hojas.

Espinoza (2013), menciona que las auxinas ayudan a la elongación de las células, entre ellas tenemos la auxina natural AIA (Ácido indolacético) y las auxinas artificiales ANA (Ácido naftalenacético), IBA (Ácido indolbutírico), PCPA (Ácido p-clorofenoxiacético), 2,4-D (Diclofenoxiacético) siendo esta la más importante y mundialmente usada en los medios de cultivo para las células y tejidos con finalidad de obtener callos porque ocasionan un crecimiento desorganizado en las células y el más débil es el AIA por que fácilmente es inactivado por la luz, los tejidos con alta actividad y es considerado un compuesto termolábil porque reacciona con temperaturas altas.

La concentración de las auxina utilizadas varía desde 0,1 – 10 mg/l siendo el rango más empleado el comprendido entre 0,25 – 3 mg/l, la actividad auxínica en células cultivadas se considera de la siguiente manera 2,4-D>ANA>AIB>AIA (Murillo, 2014).

**3.12.4.2 Citoquinina o Citocininas.** Soberón *et al.*, (2005), menciona que las citoquininas son un grupo de hormonas que regulan la división celular. Derivan de la adenina o de aminopurinas. Las diferentes cadenas laterales se unen al nitrógeno del carbono 6. Pueden presentarse como: bases libres (que constituyen las formas activas de las citoquininas), o bien ribonucleósidos, ribonucleótidos y glicósidos. La primera citocinina natural aislada fue la zeatina [N-(4-hidroxi-3-metil-2-butenil) aminopurina].

Son consideradas citoquininas aquellas sustancias químicas que pueden estimular principalmente la división celular citocinesis (Espinoza, 2013).

Murillo (2014), indica que las posibles respuestas con citocininas son: división celular, inducción a la formación de tallos y proliferación de yemas axilares, inhibición de la formación de raíces.

Espinoza (2013), casi todas las citoquininas son sintéticas y derivadas de la adenina dentro de este grupo se encuentra la kinetina (6-furturil amino-purina), BAP (6 benzil amino-purina), 2ip (6 dimetil alil purina), y la zeatina (6 hidroxil 3 metil, 2 bunitil) adenina, esta última es considerada citoquinina natural porque es extraída del endospermo del maíz. Las citoquininas realizan su efecto incrementando la división celular, dicha acción está relacionada con la presencia de auxinas.

Portillo (1999), menciona que las citoquininas son utilizadas en concentraciones que varían según la especie, pero generalmente se usan en concentraciones de 0,03 a 30 mg/l.

### **3.12.4.3 Giberelinas**

Otro regulador de crecimiento es el Ácido Giberélico (AG3), aunque no tiene un uso muy amplio pero si es esencial en el cultivo de meristemos en algunas especies de

plantas como la micropropagación con medios líquidos de vitroplantas de papa, banano y totora. (Espinoza, 2013).

Sandoval (2001), indica que las giberelinas son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en la punta de las raíces, en los frutos, tejidos jóvenes y semillas en desarrollo. Esta hormona induce el crecimiento del tallo, regulación de la transición entre la fase juvenil y adulta, inducción a la floración y la determinación sexual de la flor, inducción de la germinación a demás además de promover la elongación internodal.

### **3.12.5 Agentes Gelificantes**

La mayoría de los medios utilizados incluye un gelificante que impida que el explante se sumerja en el medio. Generalmente se utiliza Agar- Agar en concentraciones de 6-8 g/l o Gelrite en concentraciones de 1,5-3 g/l (Seemann, 1993).

En general las sustancias nutritivas empleadas en los medios de cultivo, son gelificantes con agar, el cual forma un complejo coloidal con débil poder de retención iónica (Mangara, 1988; citado por Weldt, 2008).

Según Ibrahim (1994), el Agar- Agar es el agente gelificante más utilizado en los cultivos in vitro, ya que presenta numerosas características deseables, las cuales son, claridad, estabilidad y ser un agente inerte.

Espinoza (2013) indica que desde hace mucho tiempo atrás, los medios de cultivo han sido gelificados con agar, un compuesto extraído de algas marinas del genero Gelidium. El agar se ha convertido en el material de soporte más ampliamente usado, pues provee al medio un excelente gel húmedo que sirve como soporte. La concentración de dichas sustancias está determinada generalmente por la calidad del agar, este añadido al medio de concentración de 6 a 9 g/l para medios sólidos y 2 a 4 g/l para medios semisólidos.

### 3.13.6 Acidez del Medio de Cultivo

SEEMANN (1993), indica que el pH se debe regular antes de adicionar el gelificante y debe estar entre los valores 5 y 6,5, debido a que los valores menores o mayores pueden detener el crecimiento del explante.

Una vez ajustado el pH del medio, este sufrirá una ligera acidificación progresiva como el resultado de la absorción de algunos componentes del medio así como de la excreción de exudados por parte del explante, pudiendo producir así la licuación del medio de cultivo (George y Sherrington1984).

## 4. LOCALIZACIÓN

El trabajo de investigación se realizó en dependencias del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Carrera de ingeniería agronómica, Facultad de Agronomía perteneciente a la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), ubicada en la Zona San Pedro, Calle Héroes del Acre N° 1543 del Departamento de La Paz, Provincia Murillo como se observa en la Figura 1 a una altitud de 3650 m.s.n.m, a 16° 30'00" latitud Sur y 68° 08' 00" longitud Oeste del Meridiano de Grendwich.



**Figura 1.** Ubicación Referencial De La Facultad De Agronomía UMSA.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Materiales**

#### **5.1.1 Materiales para la Preparación de Medio de Cultivo**

- Solución de Murashige y Skoog Basal en una concentración de 6g/l.
- Reguladores de crecimiento ANA (ácido naftal acético) y BAP (6 benzil amino-purina).
- Sacarosa 30 g/l.
- Myonositol 1mg/l.
- Agar 6 g/l.
- Refrigerador Consul capacidad 345 litros.
- Autoclave a presión de vapor vertical presión de 0,26 Mpa.
- Agitador magnético MSH-30D, capacidad de agitación hasta 20 litros, velocidad de 1500 rpm y potencia calorífica 1200 W.
- Medidor de pH Denver Instruments modelo 215 ph meter exactitud de 0,002 pH.
- Microondas Daewoo Capacidad de 20 litros y potencia de 700 W.
- Pipetas graduadas de 1ml y 5 ml de capacidad.
- 10 Vasos de precipitación de 250 ml.
- Vasos de vidrio cocteleras de 30 ml cada uno.

#### **5.1.2 Materiales para la Preparación de Medios de Desinfección**

- 150 ml de Alcohol al 70%.
- 150 ml de Hipoclorito de Sodio al 3%.
- Jabón desinfectante de 221ml.
- Agua destilada y autoclavada, tres frascos de 500ml.
- 2 Probetas de 250 ml.

- Frascos de vidrio cada uno de 500ml.
- 1 Piseta de 100ml.

### **5.1.3 Materiales para la Introducción de Explantes**

- Cámara de flujo laminar
- Mechero a alcohol.
- 5 Cajas Petri autoclavadas.
- Sanitizador de 300 ml.
- Plastifilm de 300 m.
- 5 Pinzas.
- 10 hojas de bisturí del N° 15.

### **5.1.4 Materiales de la Sala de Crecimiento**

- 1 Estantes con tubos Let, cada estante tiene tres divisiones conformadas de dos tubos let de 18 W.
- Termómetros mínima máxima

### **5.1.5 Material de Escritorio**

- Cuaderno de notas
- Planillas para anotar el desarrollo de las vitroplantas de Rosa.
- Computadora para guardar todos los datos recolectados.
- Cámara fotográfica para mostrar el desarrollo de las vitroplantas de Rosa.
- Programa Infostat para realizar el estudio estadístico de los datos obtenidos.

### **5.1.6 Material Vegetal**

Como material vegetal fueron 100 yemas laterales de Rosa de la variedad Freedom.

## **5.2 Metodología**

### **5.2.1 Procedimiento Experimental (Etapa 0)**

En la etapa 0 se seleccionó las condiciones físicas adecuadas para el desarrollo de las vitroplantas, se verificó el estado de sanidad de las muestras con la finalidad de que no influya en la obtención de buenos explantes.

### **5.2.2. Establecimiento del Material Vegetal a condiciones In Vitro (Etapa I)**

**5.2.2.1 Preparación del Medio de Cultivo.** El medio elegido para la introducción y desarrollo del material vegetal de rosa será el medio basal de Murashige y Skoog (1962) según lo recomendado por Hurtado en el año 1994.

El medio de cultivo es uno de los factores de los que dependerá en gran parte el éxito del cultivo in vitro por su eficiencia y regulación en los procesos como la morfogénesis y el crecimiento de los tejidos cultivados (Portillo, 1999).

Para la preparación del medio de cultivo se procedió a pesar en una balanza analítica, como se observa en la Figura 2 todos los reactivos requeridos los cuales son: Medio basal Murashige Skoog, gelificante Agar, Sacarosa y el Myonositol, de acuerdo al requerimiento necesario de la cantidad de medio de cultivo a preparar para el trabajo de investigación.



**Figura 2.** Pesado de los Reactivos que compone el Medio de Cultivo.

Una vez pesado los reactivos se introducen los mismos a un vaso de precipitado con un contenido de 100ml de agua autoclavada, donde se añade con una pipeta graduada los reguladores de crecimiento auxina ANA y la citoquinina BAP, posteriormente se afora la solución a 200ml con agua autoclavada como se muestra en la Figura 3.



**Figura 3.** Adición de Reguladores de Crecimiento y Aforado del Medio de cultivo.

Posteriormente a la adición de reguladores de crecimiento, se realiza la medición de la acides (pH) del medio de cultivo como se observa en la Figura 4, el mismo debe encontrarse estabilizado en un rango de 5,6 a 5,8. Si el pH se encuentra en un rango menor a 5,6 se le adiciona hidróxido de sodio NaOH en una concentración de 0,1 Normal, si el pH se encuentra en un rango mayor a 5,8 se le adiciona Acido Clorhidrico HCL en una concentración de 0,1 Normal, una vez estabilizado el pH se le agrega el agente gelificante Agar al medio de cultivo.



**Figura 4.** Estabilización del pH.

Seguidamente se disuelve el agente gelificante Agar con la ayuda del agitador magnético, disuelto el agar en la solución del medio de cultivo se lleva a un microondas con una potencia de 700 W durante un tiempo de 2 a 3 minutos hasta obtener una solución homogénea, se distribuye 15 ml de medio de cultivo a cada vaso de vidrio con la ayuda de un dispensador.

Cada vaso que contiene medio de cultivo se tapa con papel aluminio y se sella todo el borde superior de cada vaso con plastifilm de manera inmediata como se observa en la Figura 5, con la finalidad de evitar cualquier tipo de contaminación fuera y dentro del autoclave.

Posteriormente al sellado de los vasos se realiza la correspondiente identificación de cada uno de ellos de acuerdo a cada tratamiento en estudio.



**Figura 5.** Tapado y Sellado de vasos con contenido de Medio de Cultivo.

Después de realizar el tapado y sellado e identificación correspondiente de cada vaso de vidrio que contienen medio de cultivo de acuerdo a cada tratamiento de estudio, se llevan al autoclave de presión de vapor como se observa en la Figura 6 a una temperatura de 121°C y 15 libras de depresión durante un tiempo de 10 minutos.



**Figura 6.** Autoclavado de Medios de Cultivo.

**5.2.2.2 Preparación del Material Vegetal.** Para la preparación del material vegetal se debe retirar los agujijones presentes a lo largo de los tallos, posteriormente al retirado de los agujijones, los tallos serán disectados en varias partes con presencia de una yema lateral para cada muestra, el tamaño de la muestra debe ser de aproximadamente 10 mm de altura como se muestra en la Figura 7, con la finalidad de reducir el riesgo de contaminación, mientras más pequeña sea la muestra menor será el riesgo de contaminación.



**Figura 7.** Muestras de Rosa variedad Freedom para el establecimiento In Vitro

**5.2.2.3 Desinfección del material vegetal.** Para la desinfección del material vegetal, las muestras se lavaron con agua para retirar todas aquellas partículas que se encuentren alojadas en el material vegetal a desinfectar, retiradas las partículas se debe introducir el material vegetal en un frasco donde se agrega detergente concentrado, durante 20 minutos se debe agitar el frasco y posteriormente realizar el enjuague de las muestras.

La muestras serán llevadas a la cámara de flujo laminar de aire, donde se esterilizaran dentro de un vaso por inmersión, en una solución de alcohol de 150 ml

al 70 % de concentración (v/v) durante 10 segundos agitándose de manera constante.

Pasado los segundos establecidos se retira el alcohol en otro recipiente, retirado el alcohol se debe añadir agua destilada y autoclavada para enjuagar y retirar los restos de alcohol que hayan quedado, seguidamente se lleva a sumergir las muestras durante 10 minutos en la solución de hipoclorito de sodio al 3% (v/v), como se observa en la Figura 8.



**Figura 8.** Sumersión de muestras de Rosa variedad Freedom en Alcohol e Hipoclorito de Sodio.

Después del tiempo establecido se enjuaga con agua destilada y autoclavada hasta retirar el hipoclorito de sodio, estos enjuagues con agua destilada y autoclavada se debe hacer tres veces por un tiempo de 3 minutos con la finalidad de retirar todo residuo de alcohol e hipoclorito de sodio usado.

**5.2.2.4 Introducción del Material Vegetal.** Como se observa en la Figura 9, las muestras de Rosa variedad Freedom desinfectadas, juntamente con los medios de cultivo y el material de apoyo a usar para la siembra (mandil, barbijo, guantes, cajas petri, bisturís, mechero, sanitizador, pinzas y otros), serán llevados a la cámara de flujo laminar donde pasaran por esterilización con rayos U.V. durante 10 min.



**Figura 9.** Esterilización de los Materiales para la Introducción de Explantes de Rosa variedad Freedom.

Terminada la esterilización se procede a realizar la siembra de los explantes al medio de cultivo, se realizan cortes a los extremos basales de las muestras de Rosa de la variedad Freedom debido al daño que sufrieron los tejidos por los agentes desinfectantes, con la ayuda de las pinzas se introducen las muestras a los vasos de vidrio que contienen medio de cultivo con la debida asepsia en el material que se está usando para la siembra, con la finalidad de evitar contaminación, como se muestra en la Figura 10, al finalizar la siembra los vasos de vidrio serán flameados a lo largo de los bordes superiores y serán sellados con plastifilm e identificados con los tratamientos correspondientes, los mismos serán llevados a la sala de crecimiento o sala de incubación donde se cuenta con ambientes controlados mínimamente requeridos, con temperaturas de 25-27°C y un

fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad regulados por un temporizador analógico.



**Figura 10.** Siembra de explantes de Rosa, variedad Freedom al Medio de Cultivo.

#### **5.2.2.5 Toma de Datos**

La evaluación y análisis de datos fueron realizados para las variables de brotación, y supervivencia a los 10 días después de iniciarse la etapa de establecimiento.

Para las variables contaminación y oxidación los datos fueron tomados desde el momento de establecimiento hasta la obtención de las vitroplantas madres.

Para la evaluación de las variables altura de planta y número de hojas se realizó a los 15 días después de la etapa de establecimiento; La toma de datos se realizó periódicamente para observar el crecimiento y desarrollo de los explantes.

### 5.3 Diseño Experimental

El diseño a utilizar será completamente al azar con nueve tratamientos y 10 repeticiones con un arreglo Bifactorial, el mismo está dado por el siguiente modelo lineal aditivo (Ochoa, 2007).

#### 5.3.1 Modelo Lineal Aditivo

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij}\varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

$Y_{ijk}$  = una observación cualquiera.

$\mu$  = media de la población.

$\alpha_i$  = Efecto de la i-esima observación de concentración de auxina.

$\beta_j$  = Efecto de j-esima observación de concentración de citoquinina.

$(\alpha\beta)_{ij}$  = Interacción de la i - ésimo observación concentración de auxina con la j - ésimo observación de concentración de citoquinina.

$\varepsilon_{ijk}$  = Error experimental

#### 5.3.2 Factor de Estudio

Los criterios de selección del factor A (niveles de concentración de auxina) y factor B (niveles de concentración de citoquinina), en sus diferentes concentraciones están determinadas por investigaciones de evaluación de diferentes combinaciones de fitohormonas en la regeneración de Rosa (*Rosa* sp.), que presentan óptimos resultados con dichas concentraciones.

Weldt (2008), indica que usando concentraciones de 0,1mg/L de ANA (Ácido Naftalenacético) y 2,5 mg/L BAP (6 Benzil amino-purina) en el medio de cultivo MS se obtuvieron buenos resultado en el cultivo de *Rosa canina* L.

De acuerdo a este criterio y por los resultados óptimos que obtuvieron en el establecimiento de *Rosa canina* L., se realizaron las diferentes combinaciones de los reguladores crecimiento que representan a cada factor en estudio dentro de la investigación.

Los factores de estudio a evaluar en la investigación se detallan en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Factores de Estudio

Factor A	Factor B
a1= 0,1mg ANA	b1= 0,5mg BAP
a2= 0,2mg ANA	b2= 1,5mg BAP
a3= 0,3mg ANA	b3= 2,5mg BAP

**Fuente:** Propia, 2018.

### 5.3.3 Tratamientos

En base a los factores establecidos se realizan las siguientes combinaciones para cada tratamiento, los tratamientos se detallan en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Tratamientos en Estudio de las Concentraciones de Hormonas.

Tratamiento	Combinación	Descripción
T1	a1b1	0,1mg ANA-0,5mg BAP
T2	a1b2	0,1mg ANA-1,5mg BAP
T3	a1b3	0,1mg ANA-2,5mg BAP
T4	a2b1	0,2mg ANA-0,5mg BAP
T5	a2b2	0,2mg ANA-1,5mg BAP
T6	a2b3	0,2mg ANA-2,5mg BAP
T7	a3b1	0,3mg ANA-0,5mg BAP
T8	a3b2	0,3mg ANA-1,5mg BAP
T9	a3b3	0,3mg ANA-2,5mg BAP

**Fuente:** Propia, 2018.

#### 5.3.4 Variables de Respuesta

Las variables de respuesta consideradas a evaluar en el establecimiento de *Rosa* sp variedad Freedom se muestran bajo el siguiente detalle:

**5.3.4.1 Porcentaje de Brotación de los Explantes.** El % de brotación de los explante es el número de vitroplantas que lograron brotar de las yemas después de haber sido introducidas al medio de cultivo.

**5.3.4.2 Porcentaje de Supervivencia.** Se identificó el número de vitroplantas que lograron desarrollarse (expresar su totipotencia). La relación refiere al número de vitroplantas desarrolladas entre el número de vitroplantas totales, este valor es expresado en porcentaje.

**5.3.4.3 Porcentaje de Contaminación.** Para determinar la variable se realizó la observación de cada unidad experimental, se contó las unidades que presentaban algún tipo de contaminación (presencia de hongos y/o bacterias) como se observa en la Figura 11, de esta forma se determinó el porcentaje de contaminación.



**Figura 11.** Presencia de hongos en las hojas de Rosa variedad Freedom.

**5.3.4.4 Porcentaje de Oxidación.** Se identificó las unidades experimentales que presentan oxidación (coloración oscura en el medio de cultivo y en la parte basal del tallo) como se observa en la Figura 12, la toma de datos fue desde la siembra de los explantes a los medios de cultivo hasta la obtención de plantas madre, este valor se expresó en porcentaje.



**Figura 12.** Oxidación en el área Basal del explante de Rosa.

**5.3.4.5 Altura de las Vitroplantas.** Se midió el alto de cada vitro planta desde la base de la yema hasta el largo del tallo expresado en milímetros.

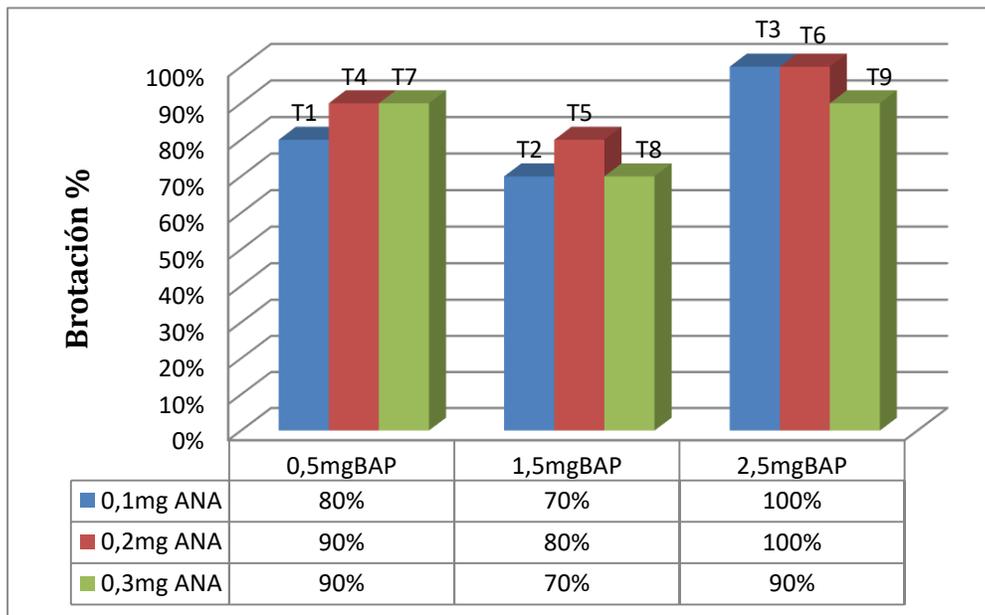
**5.3.4.6 Número de Hojas.** Se contó el número de hojas de cada vitroplanta a partir de los 15 días de haber sido establecido en el medio de cultivo.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Terminada la toma de datos y evaluado cada variable presente en el trabajo de investigación se obtuvieron los siguientes resultados.

### 6.1 Brotación de los Explantos

El porcentaje de brotación de los explantes de Rosa de la variedad Freedom es de 85,56% de vitroplantas de un total de 90 vitroplantas en estudio, en la Figura 13 se puede observar que los tratamientos con mayores porcentajes de brotación son, tratamiento tres (0,1mg ANA-2,5mg BAP) y el tratamiento seis (0,2mg ANA-2,5mg BAP) expresando 100% de brotación de un total de 10 vitroplantas en estudio.

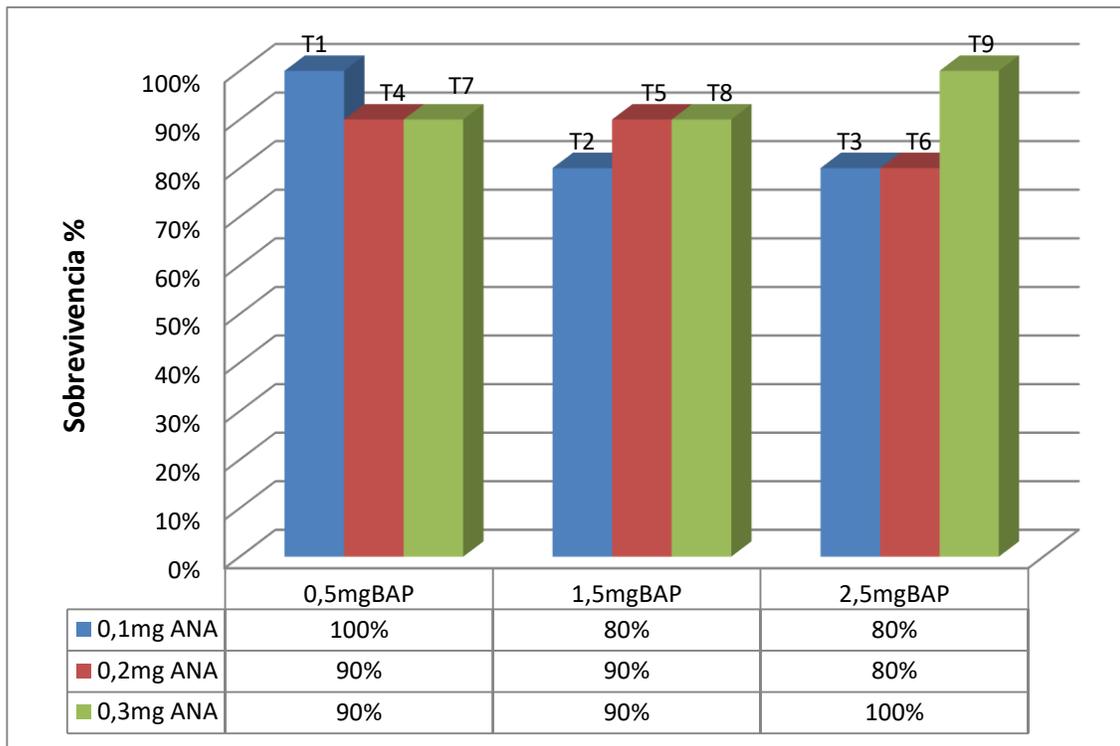


**Figura 13.** Porcentaje de Brotación de Explantes de Rosa variedad Freedom.

Espinoza (2018), menciona que las auxinas también son requeridas para el crecimiento de brotes, como los ápices vegetativos constituyen zonas activas de biosíntesis de estas. Las yemas menores a 0,4 mm no producen o retienen suficientes auxinas endógenas, lo que hace necesario la aplicación de auxina exógena a los medios de cultivo.

## 6.2. Porcentaje de Supervivencia

El porcentaje de supervivencia es de 88,89% de vitroplantas de un total de 90 vitroplantas en estudio, a la misma vez se puede observar en la Figura 14 que los tratamientos con mayores porcentajes de supervivencia son el tratamiento uno (0,1mg ANA-0,5mg BAP) y el tratamiento nueve (0,3mg ANA-2,5mg BAP) expresando 100% de supervivencia a los primeros días de haber sido introducidas al medio de cultivo.



**Figura 14.** Porcentaje de Supervivencia de Explantes de Rosa variedad Freedom.

### 6.3 Porcentaje de Contaminación

En el Cuadro número 3, se observa un porcentaje de vitroplantas no contaminadas de 84,44 % dando un 15,56 % de vitroplantas contaminadas del total de 90 vitroplantas en estudio, el tratamiento número nueve (0,3mg ANA-2,5mg BAP) con mayor porcentaje de contaminación en relación a los demás tratamientos.

**Cuadro 3.** Porcentaje de Contaminación de las Vitroplantas de Rosa.

Tratamiento	Plantas Sin Contaminación	Plantas Contaminadas	Total de Plantas	Contaminación (%)
T1	9	1	10	10
T2	9	1	10	10
T3	8	2	10	20
T4	9	1	10	10
T5	9	1	10	10
T6	8	2	10	20
T7	8	2	10	20
T8	9	1	10	10
T9	7	3	10	30
<b>TOTAL</b>	<b>76</b>	<b>14</b>	<b>90</b>	<b>X=15,56</b>

**Fuente:** Propia, 2018.

Según Pérez (1998) citado por Weld (2008), el hombre interviene directamente en todas las operaciones que se realizan en el cultivo invitro de plantas es una fuente primaria de contaminantes a través del estornudo, la tos, la conversación, etc.

Pérez (1998), indica que la contaminación del cultivo in vitro es uno de los principales problemas en la industria de la micropropagación. Los contaminantes pueden originarse de dos fuentes distintas, primeramente aquellos que vienen en la superficie o en los tejidos de la planta donadora y en segundo lugar los que aparecen como resultado de las fallas en los procedimientos de laboratorio.

El trabajo dentro de la cabina de flujo laminar es donde el operario puede introducir la mayoría de los microorganismos, el incumplimiento del manejo adecuado del operario desde el lavado incorrecto de las manos, las disposiciones adecuadas de los frascos e instrumentos dentro de la cámara de flujo laminar , pasar las manos y brazos por encima de los frascos destapados con medio de cultivo, hasta la no limpieza de los mismos antes de ser utilizados, contribuyen al incremento de la contaminación.

#### **6.4 Porcentaje de Oxidación**

En el Cuadro número 4, se observa un porcentaje de vitroplantas oxidadas de 31,11 % y un 68,89 % de plantas que no presentaron oxidación, de un total de 90 vitroplantas en estudio, el mismo cuadro muestra que los mayores porcentajes de oxidación recaen en el tratamiento cuatro (0,2mg ANA-0,5mg BAP) presentando un 50 % de oxidación de un total de 10 tratamientos en estudio, también se debe mencionar que todos los tratamientos presentaron % de oxidación, esto debido principalmente al daño que sufre los tejidos en el momento de realizar los cortes de la parte basal de las muestras de Rosa de la variedad Freedom a ser introducidas al medio de cultivo.

**Cuadro 4.** Porcentaje de Oxidación de las Vitroplantas de Rosa de la variedad Freedom.

Tratamiento	Vitroplantas Sin Oxidación	Vitroplantas Oxidadas	Total De Vitroplantas	Porcentaje De Oxidación (%)
T1	8	2	10	20
T2	7	3	10	30
T3	6	4	10	40
T4	5	5	10	50
T5	8	2	10	20
T6	6	4	10	40
T7	6	4	10	40
T8	8	2	10	20
T9	8	2	10	20
<b>TOTAL</b>	<b>62</b>	<b>28</b>	<b>90</b>	<b>X=31,11</b>

**Fuente:** Propia, 2018.

Weldt (2008), tanto los explantes como el medio de cultivo de algunas especies, sobre todo leñosas, una vez puestas en cultivo in vitro, tienen la tendencia a manifestar un pardeamiento que, en forma extrema lleva a la muerte de los explantes. Este pardeamiento se produce por la acción de enzimas oxidasas y las tirosinasas, que se liberan al herirse los tejidos.

Preece y Compton (1991), mencionan que cuando los tejidos son dañados, por ejemplo durante la preparación del explante, los compuestos fenólicos que están

acumulados en grandes cantidades en las vacuolas se mezclan con el contenido de los plastidios y otros organelos donde están confinadas las polifenoloxidasas y aparece la coloración negra o marrón como consecuencia del proceso de oxidación.

Pérez (1998), las oxidaciones fenólicas pueden ocasionar un serio problema en el establecimiento y supervivencia de meristemos y ápices, las cuales se manifiestan como un ennegrecimiento del medio de cultivo por la zona cercana al explante y puede extenderse a todo el medio produciendo una seria afección en el crecimiento del explante, al que puede provocar la muerte.

### 6.5 Altura de Planta

El análisis de varianza de la variable altura de planta se observa un coeficiente de variación de 7,70% el cual se encuentra dentro de los rangos permitidos por lo que podemos indicar que los datos obtenidos son confiables.

**Cuadro 5.** Análisis de Varianza para la Altura de Vitroplanta.

F.V.	S.C	G.L	C.M	F	p-valor
FACTOR A(auxina ANA)	31,12	2	15,56	2,71	0,0724ns
FACTOR B(CITOQUININA BAP)	2268,62	2	1134,31	197,80	<0,0001**
FACTOR A*B	172,83	4	43,21	7,53	<0,0001**
ERROR	464,50	81	5,73		
TOTAL	2937,06	89			

**Fuente:** Propia, 2018.

Coefficiente de variabilidad CV=7,70

NS= No significativo

\*= Significativo

\*\* = Altamente significativo

Según el análisis de varianza que se observa en el Cuadro 5, nos presenta que el factor A (auxina ANA) no presenta significancia, pero en el factor B (citoquinina) y la interacción del factor A\*B presentan diferencias significativas a un nivel de 5% de significancia.

**Cuadro 6.** Prueba Duncan para el Factor B: Citoquinina (BAP)

Concentración de ANA	MEDIAS	N	E.E.			
2,5mg	38,5	30	0,44	A		
1,5mg	28,88	30	0,44		B	
0,5mg	26,37	30	0,44			C

**Fuente:** Propia, 2018.

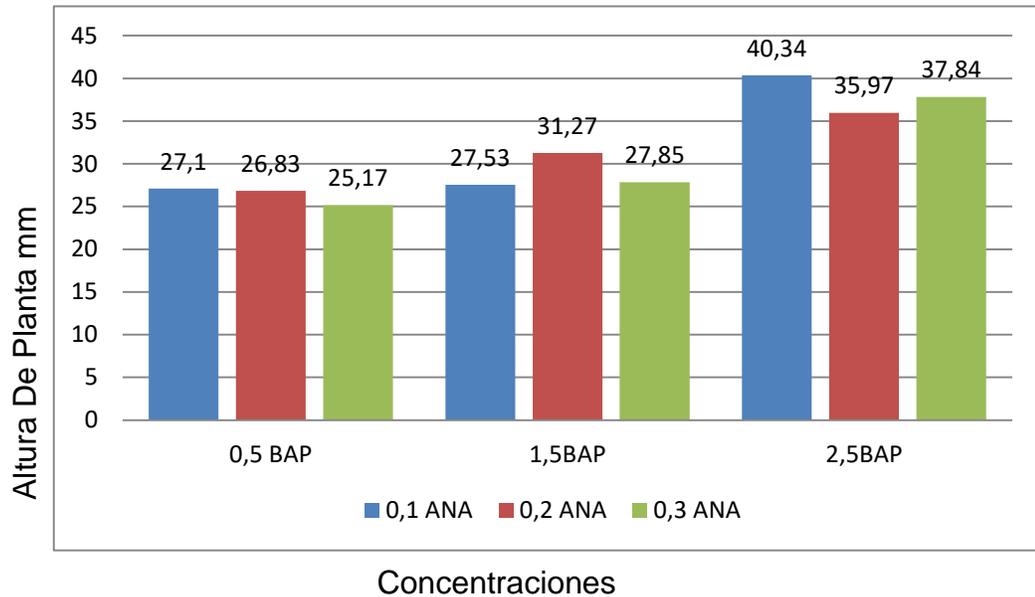
Para el factor B se encontró alta significancia por lo que se efectuó la prueba de medias de Duncan (5% de significancia); en el Cuadro 6 se observa el resultado, donde se puede afirmar que existen diferencias entre los tres niveles de concentración de citoquinina en relación a la altura de planta, dando como resultado con mayor porcentaje de altura de planta a una concentración de BAP 2,5mg/L, sin embargo este valor es estadísticamente superior a las concentración de 1,5mg/L, por otra parte estos valores son significativamente superiores a la concentración de 0,5mg/L.

**Cuadro 7.** Prueba Duncan para el factor A \* Factor B:( ANA\*BAP).

FactorA*factor B	MEDIAS	N	E.E.					
0,1mg *2,5mg	40,34	10	0,76	A				
0,3mg* 2,5mg	37,84	10	0,76		B			
0,2mg* 2,5mg	35,97	10	0,76		B			
0,2mg*1,5mg	31,27	10	0,76			C		
0,3mg*1,5mg	27,85	10	0,76				D	
0,1mg*1,5mg	27,53	10	0,76				D	
0,1mg*0,5mg	27,10	10	0,76				D	E
0,2mg*0,5mg	26,83	10	0,76				D	E
0,3mg*1,5mg	25,17	10	0,76					E

**Fuente:** Propia, 2018.

Para el factor A \* B se encontró alta significancia por lo que se efectuó la prueba de medias de Duncan (5% de significancia); en el Cuadro 7 se observa el resultado, donde se puede afirmar que existen diferencias significativas entre las interacciones del factor A con el factor B, dando como mejores resultados las interacciones de 0,1mg ANA \* 2,5mg BAP, sin embargo este valor es estadísticamente superior a los demás niveles de concentraciones que se encuentran en interacción entre ANA \* BAP.



**Figura 15.** Efecto de los tratamientos altura de vitroplantas

La Figura 15 muestra que los niveles de concentración que presentan mayor altura de planta son aquellas con menor concentración de auxinas y mayor concentración de citoquininas. Así también se debe destacar que las interacciones entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo producen crecimiento de los explantes.

Murillo (2014), indica que las posibles respuestas con citocininas son: división celular, inducción a la formación de tallos y proliferación de yemas axilares, inhibición de la formación de raíces.

Murashige skoog (1962), menciona que la iniciación de raíces y brotes en las plantas, se encuentran reguladas básicamente por la interacción entre auxinas y citoquininas, a si una relación de auxina-citoquinina menor a uno favorece la brotación, mientras que si es mayor a uno se induce el enraizamiento de los explantes.

Cuando se cultivan los explantes en medios con concentraciones elevadas de citoquininas desarrollan el crecimiento de las plantas (Vuylstke y De Langhe 1985).

## 6.6 Número de Hojas

Para el análisis de varianza de esta variable se observa un coeficiente de variación de 13,50 % el cual se encuentra dentro de los rangos permitidos por lo que los datos obtenidos son confiables.

**Cuadro 8.** Análisis de Varianza para el Número de Hojas

F.V.	S.C	G.L	C.M	F	p-valor
FACTOR A(auxina ANA)	4,27	2	2,13	3,15	0,0483
FACTOR B(CITOQUININA BAP)	51,67	2	25,86	38,11	<0,0001**
FACTOR A*B	21,27	4	5,32	7,84	<0,0001**
ERROR	54,90	81	0,56		
TOTAL	132,10	89			

**Fuente:** Propia, 2018.

Coeficiente de variabilidad CV=13,50

NS= No significativo

\*= significativo

\*\* = altamente significativo

Según el análisis de varianza que se observa en el Cuadro 8, el factor B (BAP) es altamente significativo donde presenta diferencias significativas en los tres niveles de concentraciones de por otro lado la interacción A x B (ANA x BAP) presenta alta significancia a un nivel de 5% de significancia.

**Cuadro 9.** Prueba Duncan para el Factor B (Citoquinina)

Concentración de BAP	MEDIAS	N	EE			
2,5 mg	7,1	30	0,15	A		
2,5 mg	5,93	30	0,15		B	
0,5 mg	5,27	30	0,15			C

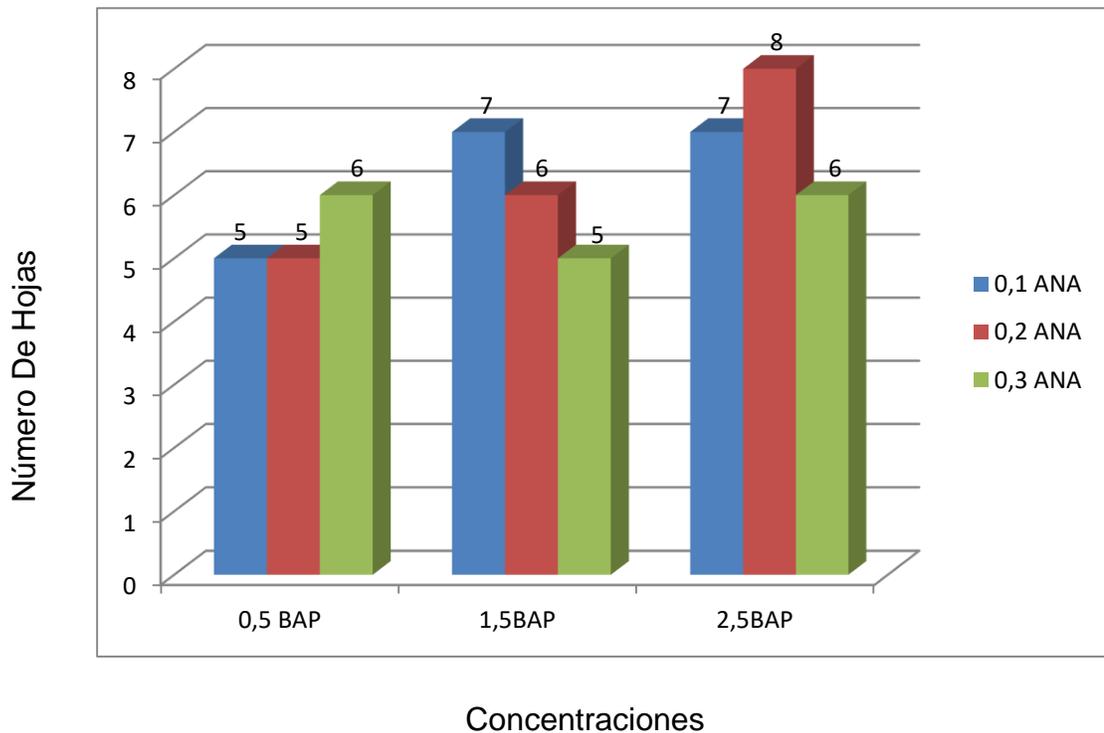
**Fuente:** Propia, 2018.

Para el factor B se encontró alta significancia por lo que se efectuó la prueba de medias de Duncan (5% de significancia); en el Cuadro 9 se observa el resultado, donde se puede afirmar que existen diferencias en los tres niveles de concentración de citoquininas, dando como resultado con mayor porcentaje de número de hojas a la concentración de 2,5 mg/L BAP, sin embargo esta concentración es superior a la concentración de 1,5 mg/l BAP, por otro lado ambas concentraciones son superiores en cuanto a los resultados de número de hojas a la concentración 0,5mg/l BAP

**Cuadro 10.** Prueba Duncan para el Factor A\* Factor B: (ANA\*BAP)

FactorA*factor B	MEDIAS	N	E.E.					
0,2mg *2,5mg	7,60	10	0,26	A				
0,1mg* 2,5mg	7,50	10	0,26	A				
0,1mg* 1,5mg	6,70	10	0,26		B			
0,3mg*2,5mg	6,20	10	0,26		B	C		
0,3mg*0,5mg	5,80	10	0,26			C	D	
0,2mg*1,5mg	5,60	10	0,26			C	D	E
0,3mg*1,5mg	5,50	10	0,26			C	D	E
0,2mg*0,5mg	5,10	10	0,26				D	E
0,1mg*0,5mg	4,90	10	0,26					E

Para el factor AxB se encontró alta significancia por lo que se efectuó la prueba de medias de Duncan (5% de significancia); en el cuadro 12 se observa el resultado, donde se puede afirmar que existen diferencias entre las interacciones del factor A con el factor B, dando como mejores resultados las interacciones de 0,2mg ANA \* 2,5mg BAP, sin embargo este valor es estadísticamente superior a los demás niveles de concentraciones que se encuentran en interacción entre ANA \* BAP.



**Figura 16.** Efecto de tratamientos número de hojas

La Figura 16, se muestra que los niveles de concentración que presentan mayor número de hojas se dan usando 2,5mg/l de BAP y 0,2mg/l de ANA dando mayor número de hojas en comparación a los de más tratamientos.

Margara (1988), indica que es necesario uno o más sustancias reguladoras de crecimiento, frecuentemente auxinas y/o citoquininas, pero a veces también

giberelinas, ácido abscísico o etileno para mejorar el desarrollo del cultivo invitro de tejidos y órganos.

Murillo (2014), las posibles respuestas al tratamiento con citoquininas son: División celular, inducción a la formación de tallos y proliferación de yemas axilares, inhibición de la formación de raíces.

Portillos (1999), indica que combinando dosis de Ácido Naftalacético(ANA) entre 0,1 y 0,3 mg con dosis de Bencilaminopurina (BAP) con un rango entre 0,5 y 2,5 mg/l pudieron promover la inducción de hojas de rosas en el cultivo de rosal en la variedad Samantha, Cristale y Pech.

Talón (2000), las citoquininas regulan varios procesos del desarrollo de las plantas, incluyendo división celular, proliferación de yemas axilares, senescencia foliar y floración, entre otros. Gran parte de estos procesos están afectados por otros estímulos especialmente ambientales y hormonales como caso típico esta la interacción de las citoquininas con las auxinas que se utilizan para regular la neoformación de órganos in vitro y controlar la dominancia apical fundamental en la industria de la micropropagación.

## 7. CONCLUSIONES

Con relación a los resultados obtenidos podemos concluir lo siguiente:

Que El uso de Reguladores de crecimiento, Auxinas y Citoquininas en el medio de cultivo Murashige Skoog favorecen a la obtención de vitroplantas madre de Rosa (*Rosa sp.*) variedad Freedom.

En cuanto al desarrollo de los explantes de Rosa (*Rosa sp.*) variedad Freedom, se observó un mejor crecimiento añadiendo al medio de cultivo las concentraciones de 0,1mg/l de Ácido naftalenacetico (ANA) y 2,5 m/l de 6-benzil amino purina (BAP), dando como promedio de altura de planta 40,34 mm.

En cuanto al desarrollo de número de hojas , usando la concentración de 0,2mg/l de Ácido naftalenacetico (ANA) y 2,5 mg/l 6-benzil amino purina (BAP) en el medio de cultivo, se obtuvo mayor número de hojas en las vitroplantas presentando como promedio 8 hojas, y por lo anteriormente mencionado se destaca que el regulador de crecimiento que intervine en el desarrollo de las hojas en vitroplantas de Rosa (*Rosa sp.*) variedad Freedom , es el regulador de crecimiento 6-benzil amino purina (BAP), por lo mismo concluyo que los distintos niveles de concentración de 6-benzil amino purina adicionados al medio de cultivo dieron diferentes resultados, adicionando 2,5 mg/l de 6-benzil amino purina (BAP) dio un promedio de 7 hojas, usando 1,5 mg/l de 6-benzil amino purina (BAP) 6 hojas como promedio, y por ultimo usando 0,5 mg/l de 6-benzil amino purina (BAP) se obtuvo como promedio 5 hojas. Mientras mayor sea la adición de 6-benzil amino purina (BAP) al medio de cultivo mejores serán los resultados en el desarrollo de las hojas de Rosa (*Rosa sp.*) variedad Freedom.

Con relación al porcentaje de contaminación presente en las vitroplantas se llegó a obtener un porcentaje de 15,56 por ciento de presencia de hongos en el medio de cultivo, esto debido a que las muestras de Rosa podrían haber tenido presencia de

hongos en los tejidos, este porcentaje de contaminación también se debe al manejo inadecuado de algún material utilizado en el momento de preparación del medio de cultivo y en el momento de introducción de los explantes.

Con los resultados obtenidos anteriormente se llega a concluir que el porcentaje de oxidación es de 31,11 por ciento de un total de 90 vitroplantas en estudio, este resultado principalmente se debe a los tejidos dañados que se produjeron en el momento del corte de los explantes.

La oxidación se debe a la acción de las enzimas oxidasas y las tirosinasas que se liberan al herirse los tejidos.

En la investigación realizada se concluye que la concentración óptima de reguladores de crecimiento Auxinas y Citoquininas, es de 0,1mg/l de ANA (Ácido Naftalenacético), y 2,5mg/l de BAP (6-benzil amino-purina), los cuales presentaron un mejor establecimiento de Rosa (*Rosa sp*) variedad Freedom en el medio de cultivo.

## 8. RECOMENDACIONES

- Para contrarrestar el efecto de oxidación se recomienda adicionar antioxidantes al medio de cultivo como ser el ácido ascórbico, ácido cítrico, y carbón activo, se recomienda cambios de medio de cultivo cada vez que se observe fenolización
- Para evitar la contaminación se recomienda tener más asepsia en el manejo de las vitroplantas y añadir antibióticos en el momento de preparación del medio de cultivo.
- Se recomienda hacer investigaciones usando mayores niveles de concentración del Regulador de crecimiento BAP (6- benzil aminopurina) dentro de los parámetros recomendados en el cultivo in vitro en la fase de establecimiento.
- Se recomienda hacer investigaciones usando yemas apicales, yemas basales y yemas laterales para el establecimiento de Rosas.
- Se recomienda usar otro tipo de regulador de crecimiento en el caso de la auxinas, para el enraizamiento de las vitroplantas de Rosa como ser ( Ácido Índol Acético) AIA.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Alsmeer, 2003. Handbook for modern greenhouse rose cultivation. Applied Plant Research Praktijkonderzoek Plant Omgeving. Netherlands.203p.
- Akita, M. y Shigeoka, T. 1994. Mass Propagation of shoots of *Stevia rebaudiana* using a large scale bioreactor. *Plant Cell Reports*, 13:180-183.
- Ashmore, E. 1997. Informe de estado: desarrollo y usos de técnicas in vitro para la conservación y empleo de plantas recursos genéticos. *Planta Internacional Instituto de Recursos Genético*. 67 p.
- Alvarado, F.2010. Factibilidad Económica Financiera del sistema de Producción de Rosa de Exportación en diferentes sustratos en la Sabana. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.30p.
- Barba, A. Luna, B.; Romero, J. 2001. Micropropagacion de plantas. Editorial Trillas. Mexico. D.F. p. 7-53.
- Carrillo, E. 2004 Manipulación de plantas madres para el enraizamiento consultado en octubre del 2016. Disponible en <http://www.ELUCAS42@HOTMAIL.COM>.
- Deberech, M. Maene, T. 1981. Plant tissue culture, and alternative for production of usefult metabolites. *Agricultural services bulleting*. p.108- 187.
- Espinoza, R. 2013. Biotecnología Agrícola: Introducción a la Biotecnología Vegetal. Esp. 1º ed. BO. Universitaria. 68p.
- Fushs, H. 1950. Rosales. Barcelona, España. Gustavo Gillis. 238p.
- González C. 2003. Evaluación, detección y método de control somaclonal en el clon Gran Enano (*Musa sp.*). Instituto de biotecnología vegetal Cuba 102pp.
- Gonzáles, T. 2007 Ajuste de medios para la micropropagación de palmito (*bactris gasipaes h.b.k.*) a partir de meristemas apicales Disponible en: [www.upao.edu.pe/new\\_pregrado/mantenimientosilabo/silabus/20/10/2016](http://www.upao.edu.pe/new_pregrado/mantenimientosilabo/silabus/20/10/2016).
- George, E. y Sherrington, P. 1984. Plant propagation by tissue culture:handbook and directory of commercial laboratories. Eversley, Basingstoke,England Exegetics. 709p.

- Hatmant, H., Kester, D., Davies, F. y Geneve, R. 2002. Plant Propagation Principles and Practices. New Jersey, Estados Unidos. Prentice Hall. 880p.
- Hatmant, H. y Kester, D. 1997 Propagación de plantas 5ª Reimpresión. México. Compañía Editorial Continental S.A. de C.V. 760p.
- Hernández, R. 1997. Obtención de plantas libres de patógenos. En curso internacional de propagación *in vitro* de especies vegetales. Instituto de Biotecnología de las plantas. P. 24-31.
- Hernández, R.;Fontella, J.; et al. 1995. Electroterapia: nueva técnica para el saneamiento a virus en *Allium sativum* (pat.37/95 Cuba).
- Hewstone, G. Reyes, S. 2011. Effect of gelling agent and activated charcoal on the growth and development of *Cordyline terminalis* cultured *in vitro*. Proceedings of the First Conference of Ornamental Horticulture. Cairo, Egypt. October 22-24, p.55-67.
- Hurtado, D. y Merino, M. 1994. Cultivo de tejidos Vegetales. Editorial Trillas México D. F.S.A. 226p.
- Hu, CV. y JP, Wang 1983. Meristem, shoot tip and bud culture. En: Handbook of plant Cell. p 256-290.
- Ibrahim, A. 1994. Effect of gelling agent and activated charcoal on the growth and development of *Cordyline terminalis* cultured *in vitro*. Proceedings of the First Conference of Ornamental Horticulture. Cairo, Egypt. October 22-24, p.55-67.
- INFOAGRO. 2003. Cultivo del Clavel. Consultado en octubre del 2016. Disponible en <http://www.infoagro.com>.
- Kartha, K.1981. Meristem culture and cryopreservation: Methods and applications. En: Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture. T. New York: Academic Press. P 181-211.
- Kitto,S.L. 1997. Commercial micropropagation. HortScience. Vol 32 (6).
- Litz, R.E. y Jarret, R.L. 1991. Regeneración de plantas en cultivos de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En cultivos de tejidos en la agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. p. 143-172.

- Mangara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo invitro, los meristemas y la organogénesis. Madrid, España. Mundi prensa.232p.
- Medina *et al.*, 2005 Cultivo *in vitro* de meristemas. La enciclopedia libre. Consultado en Octubre 2016 disponible en: [http://www etsea 2.ud/. es/in vitro](http://www.etsea2.udl.es/invitro).
- Medina, M. 2005. Organismos vegetales. Fundamentos de la organografía vegetal.(Online)<<http://www.unizar.es/departamentos/bioquimicabiologia/docencia/FMBvisual/Micropropa/Micvegetal.htm>> (05 abril 2007).
- Mendoza, D. 1994. Y Villalba, J. 2003. Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro. Los meristemas y la organogénesis. Madrid, España. Mundi Prensa. 232p.
- Morel,G. y Martin, C. 1955. Guerison de ponme de terre de maladie a virus. C.R. Acad. Sci. Paris. 1315-1324.
- Moya, T. Mederos, B. 2001. Cultivo de meristemas para la eliminación del virus S de la papa en plantas cultivadas in vitro. Tesis.Cuba, CU. Instituto de Biotecnología de la Plantas. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. 119 p.
- Murillo, R. 2014. Introducción a la Biotecnología Agrícola: Historia del cultivo de tejidos vegetales. Esp. 1º ED. Bo. MMAYA. 101p.
- Murashige y Skoog, 1962 Arevised médium for tapid growth and bioassays with tobacco tissue. Plant cell Physiol. pp.803-814.
- Ochoa T. R., 2007. Diseños experimentales. La Paz, Bolivia. 298 p.
- Pérez, J. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. 179-191p.
- Penacho *et al.*, 2007 Cultivo invitro consultado en octubre del 2016 disponible en:[http://www.wetea2 udl. es/ in vitro/meristpat. Htm](http://www.wetea2.udl.es/invitro/meristpat.Htm)
- Portillo, G. 1999. Respuesta de tres cultivares de rosal (*Rosa sp.*) variedad samntha, cristaline y peach, a la multiplicación y enraizamiento de brotes invitro en diferentes proporciones de auxinas-citoquininas. Guatemala. tesis de Licenciatura. Facultad de agronomía. Universidad de San Carlos .3p.

- Precce, R. y compton, S. 1991. Automation in plant propagation. *Plant Cell, Tissue and organs Culture*, 39(2) p 105-108.
- Preil, W. 1991. Application of bioreactors in plants propagation. En: *Micropropagation*. Debergh. Academy Publisherts, p. 425-445.
- Quiroz, W. 2014. Evaluación del comportamiento del botón de a variedad de Rosa (Rosa sp.) Freedom, usando cinco colores de capuchón en la finca florícola Manuela Tabacundo. Tesis de Licenciatura. Universidad Politécnica Salesiana sede Quito. 35p
- Reuveni, O.; et al. 1985. Genetic variability in banant plants mutiplied via in vitro culture. IBPGR. Final. Report, 36p.
- Redenbaugh, K. 1986. Analog of botanic sedes. U.S. Patent. 4: 562-563.
- Rosen, Tantau. 2005. Ficha técnica de la variedad de Rosa Freedom. *Ficha técnica de la variedad freedom*.
- Rojas, P. 2003. Propagación de plantas: Principios y prácticas. Séptima Reimpresión. Traducido por: Marino, A. Compañía Editorial Continental S.A. México D.F. 760 p.
- Sabja, A. 1980. Métodos de propagación vegetativa de algunas especies leñosas chilenas con posibilidades ornamentales. Tesis de Licenciatura. Santiago. Universidad de Chile Facultad de ciencias forestales. 119-120p
- Sandoval, C. 2001. Introducción a la Biotecnología Vegetal. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. (CEDAF). Santo Domingo, República Dominicana. p. 23-25.
- Sandoval, R. et. al. 2005. Empleo del Vitrofurul en la esterilización química del endospermo artificial de los embriones somáticos encapsulados de Saccharum spp. híbrido var Cuba 87- 51. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Villa Clara. Cuba. Consultado el 21 de mayo 2012. Disponible en: <http://revista.ibp.co.cu/2002/127-empleo-del-vitrofurul-en-la-esterilizacion-quimica-del-endospermo-artificial-de-los-embriones-somaticos-encapsulados-de-saccharum-spp-hibrido-var-cuba-87-51-.html>

- Segretín, M. 2006. Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). INGEBI-CONICET - Dpto. FBMyC, FCEyN-UBA. ArgenBio. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Consultado el 21 de mayo 2012. Disponible en:<http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf>
- Seemann, J.K. 1993. Callus induction and culture of rosa. *Sci. Hortic* 17:361-370.
- Takayama, S. y Akita, M. 1996. Biorreactor advances for the large-scale production of cultured cells. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Amer. J. Bot.* 45:705-708.
- Talón, 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. España. p522.
- Vasil, I.K. 1994. Automation in plant propagation. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 39(2): 105-108.
- Villalobos, W.M. y Garcia, r. 1982. Micropropagación; conceptos metodología y resultados en cultivos de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Ed. William Roca. P. 127-141.
- Weldt, E. 2008. Establecimiento, multiplicación y enraizamiento invitro de rosa canina .Chile. Tesis de Licenciatura. Facultad de agronomía.2p.

# ANEXOS



**Anexo N° 1** Rosas de la variedad Freedom



**Anexo N°2** Recolección de las muestras más vigorosas



**Anexo N°3** muestras para la introducción al medio de cultivo



**Anexo N° 4** Pesado de reactivos



**Anexo N° 5** Preparación del medio de cultivo



**Anexo N°6** Introducción del medio de cultivo al autoclave



**Anexo N°7** Autoclavado de los medios de cultivo



**Anexo N°8** Preparado de los medios desinfectantes



**Anexo N°9** Desinfección de los explantes



**Anexo N°10** Introducción del material vegetal



**Anexo N°11** Desarrollo de las vitroplantas



**Anexo N°12** Presencia de hongos

Estadístico	Valor	gl	p	
Chi Cuadrado Pearson	6,92	8	0,5450	ns
Chi Cuadrado MV-G2	8,93	8	0,3478	
Coef.Conting.Cramer	0,20			
Coef.Conting.Pearson	0,27			

**Anexo N° 13 Prueba de Ch Cuadrado variable Brotacion**

Estadístico	Valor	gl	p	
Chi Cuadrado Pearson	4,95	8	0,7629	ns
Chi Cuadrado MV-G2	6,76	8	0,5628	
Coef.Conting.Cramer	0,17			
Coef.Conting.Pearson	0,23			

**Anexo N° 14 Prueba de Ch Cuadrado variable Supervivencia**

Estadístico	Valor	gl	p	
Chi Cuadrado Pearson	3,21	8	0,9202	ns
Chi Cuadrado MV-G2	3,05	8	0,9311	
Coef.Conting.Cramer	0,13			
Coef.Conting.Pearson	0,19			

**Anexo N° 15 Prueba de Ch Cuadrado variable Contaminación**

Estadístico	Valor	gl	p	
Chi Cuadrado Pearson	5,08	8	0,7489	ns
Chi Cuadrado MV-G2	5,10	8	0,7464	
Coef.Conting.Cramer	0,17			
Coef.Conting.Pearson	0,23			

**Anexo N° 16** Prueba de Che Cuadrado variable Oxidación