



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Implementación de un protocolo de cultivo *in vitro* de rosas de corte (*Rosa hybrida* L.) a partir de segmentos nodales para la propagación masiva de plantas.**

Montalvo Velasteguí, Xavier Aldryn

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Segovia Salcedo, María Claudia PhD.

10 de agosto de 2021

## Resultado del análisis de Urkund



### Document Information

<b>Analyzed document</b>	Xavier Aldryn Montalvo_Trabajo de titulacion_1.docx (D111205474)
<b>Submitted</b>	8/12/2021 1:33:00 PM
<b>Submitted by</b>	SEGOVIA SALCEDO CLAUDIA
<b>Submitter email</b>	mcsegovia@espe.edu.ec
<b>Similarity</b>	2%
<b>Analysis address</b>	mcsegovia.espe@analysis.arkund.com

### Sources included in the report

<b>W</b>	URL: <a href="http://142.93.18.15:8080/jspui/bitstream/123456789/91/1/listo%20correcciones.pdf">http://142.93.18.15:8080/jspui/bitstream/123456789/91/1/listo%20correcciones.pdf</a> Fetched: 8/1/2021 12:40:26 AM		1
<b>W</b>	URL: <a href="http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/6332/T14481%20HERN%20C3%81NDEZ%20ROSAS%20C%20PATRICIA%20%2058356.pdf?sequence=1&amp;isAllowed=y">http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/6332/T14481%20HERN%20C3%81NDEZ%20ROSAS%20C%20PATRICIA%20%2058356.pdf?sequence=1&amp;isAllowed=y</a> Fetched: 3/17/2021 3:57:19 AM		1
<b>W</b>	URL: <a href="https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/27702/1/MalutinCarballoLilianaMar%C3%ADa.pdf">https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/27702/1/MalutinCarballoLilianaMar%C3%ADa.pdf</a> Fetched: 7/26/2021 7:13:49 PM		1
<b>W</b>	URL: <a href="https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/982/1/T-ESPE-023928.pdf">https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/982/1/T-ESPE-023928.pdf</a> Fetched: 12/30/2019 11:00:47 PM		1
<b>W</b>	URL: <a href="http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2631.pdf">http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2631.pdf</a> Fetched: 2/9/2021 4:31:42 PM		1
<b>W</b>	URL: <a href="https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/19601/1/UPS-TTQ185.pdf">https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/19601/1/UPS-TTQ185.pdf</a> Fetched: 6/29/2021 5:48:23 PM		1
<b>W</b>	URL: <a href="https://en.wikipedia.org/wiki/Order_of_operations">https://en.wikipedia.org/wiki/Order_of_operations</a> Fetched: 8/12/2021 1:34:00 PM		1





**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, “**Implementación de un protocolo de cultivo *in vitro* de rosas de corte (*Rosa hybrida* L.) a partir de segmentos nodales para la propagación masiva de plantas**” fue realizado por el señor **Montalvo Velasteguí, Xavier Aldryn** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 10 de septiembre de 2021

.....  
**Segovia Salcedo, María Claudia PhD.**

C. C. 1709055998



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Montalvo Velasteguí, Xavier Aldryn**, con cédula de ciudadanía n° 1725809139, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Implementación de un protocolo de cultivo *in vitro* de rosas de corte (*Rosa hybrida* L.) a partir de segmentos nodales para la propagación masiva de plantas** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 10 de septiembre de 2021

Montalvo Velasteguí, Xavier Aldryn

C.C.: 1725809139

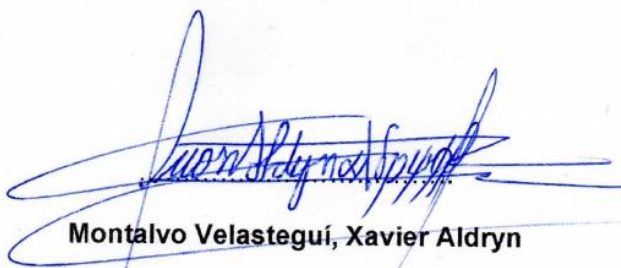


DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Montalvo Velasteguí, Xavier Aldryn**, con cédula de ciudadanía n° 1725809139, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Implementación de un protocolo de cultivo *in vitro* de rosas de corte (*Rosa hybrida* L.) a partir de segmentos nodales para la propagación masiva de plantas** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 10 de septiembre de 2021



**Montalvo Velasteguí, Xavier Aldryn**  
C.C.: 1725809139

## **Dedicatoria**

A mi familia por ser mi apoyo incondicional, por estar a mi lado y velar por mi formación personal y académica. Todos mis logros siempre serán dedicados a ustedes por todo su esfuerzo y cariño.

Xavier Aldryn Montalvo Velasteguí

## Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi gratitud a la empresa Conectiflor Andino S.A. que abrió sus puertas y aportó el financiamiento para el desarrollo de mi trabajo de titulación. Deseo agradecer también al personal de campo, administrativo y sus directivos por compartir sus conocimientos, consejos y brindarme la experiencia que ahora será un baluarte de mi formación profesional.

A Claudia Segovia PhD., por ser una persona íntegra y un ejemplo de lucha por la equidad. Gracias por todo el ímpetu que demuestra en la ilustre profesión de la enseñanza, por ayudarme a incursionar en el fascinante mundo de la investigación como su pasante y gracias por los consejos y el esfuerzo durante el desarrollo de este proyecto.

A mis padres Ramiro y Marianela, porque su amor incondicional y trabajo abnegado son y serán el cimiento de mis logros. Gracias por velar infatigablemente por mi bienestar, por los consejos y valores impartidos, por permitirme soñar con libertad y confiar en mí.

A mi hermano Kevin, por estar a mi lado en los buenos y malos momentos, gracias porque puedo contar con tu apoyo desinteresado o tu atención para compartir mis anhelos y preocupaciones. Espero que siempre tengas presente que te quiero mucho.

A mis amigos Tannya, María Fernanda, Camila, Juan Pablo y todas aquellas personas cuya compañía en las aulas, compartiendo una lección de vida o simplemente con una sonrisa ayudaron a que sea un mejor ser humano e hicieron de mi pregrado una etapa memorable.

Al grupo de Biología sintética iGEM Ecuador, porque dentro del mismo mejoré mis destrezas de liderazgo, trabajo en equipo y reconocí el valor del esfuerzo *ad honorem* y la constancia.

## Índice de contenido

Resultado del análisis de Urkund .....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de autoría .....	4
Autorización de publicación .....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimientos .....	7
Índice de contenido.....	8
Listado de tablas.....	12
Listado de figuras.....	13
Listado de abreviaturas .....	15
Resumen.....	16
Abstract.....	17
Capítulo I: Introducción.....	18
Formulación del problema .....	18
Justificación del problema.....	19
Objetivos.....	20
Objetivo General.....	20
Objetivos Específicos .....	20
Capítulo II: Marco teórico.....	21
Aspectos generales del rosal.....	21
Distribución botánica y taxonomía .....	21



Morfología del rosal.....	22
Formas de propagación vegetativa.....	24
Importancia del cultivo de rosa en Ecuador.....	26
Cultivo de tejidos vegetales .....	27
Generalidades .....	27
Composición del medio de cultivo.....	29
Sales inorgánicas.....	29
Fuente de carbono.....	31
Reguladores de crecimiento.....	31
Agente gelificante. ....	33
Factores físicos.....	34
Hipótesis.....	35
Capítulo III: Materiales y métodos.....	36
Localización del ensayo .....	36
Material vegetal.....	36
Medios de cultivo.....	36
Condiciones de cultivo .....	38
Descripción de los ensayos .....	38
Etapa I: Establecimiento <i>in vitro</i> .....	38
Etapa II: Multiplicación.....	39
Etapa III: Enraizamiento <i>in vitro</i> .....	40

	10
Análisis estadístico.....	41
Capítulo IV: Resultados .....	42
Etapa I: Establecimiento <i>in vitro</i> .....	42
Contaminación.....	42
Necrosis.....	43
Viabilidad .....	45
Etapa II: Multiplicación .....	47
Índice de multiplicación .....	47
Longitud del brote.....	49
Etapa III: Enraizamiento <i>in vitro</i> .....	52
Porcentaje de enraizamiento.....	52
Número de raíces por brote .....	53
Tasa de supervivencia.....	55
Capítulo V: Discusión .....	57
Etapa I: Establecimiento <i>in vitro</i> .....	57
Contaminación.....	57
Necrosis.....	58
Viabilidad .....	59
Etapa II: Multiplicación .....	60
Índice de multiplicación .....	60
Longitud del brote.....	61

Etapa III: Enraizamiento <i>in vitro</i> .....	62
Porcentaje de enraizamiento.....	62
Número de raíces por brote .....	63
Tasa de supervivencia.....	63
Capítulo VI: Conclusiones .....	66
Capítulo VII: Recomendaciones .....	67
Referencias.....	68

### Listado de tablas

<b>Tabla 1</b>	Clasificación taxonómica de la rosa .....	21
<b>Tabla 2</b>	Composición del medio Murashige & Skoog.....	37
<b>Tabla 3</b>	Tratamientos aplicados para la desinfección de segmentos nodales. ....	39
<b>Tabla 4</b>	Tratamientos para evaluar el efecto de la concentración de ANA en la proliferación de brotes de rosa. ....	40
<b>Tabla 5</b>	Tratamientos para el enraizamiento in vitro de brotes de rosa. ....	41
<b>Tabla 6</b>	Porcentaje de contaminación en la fase de establecimiento de segmentos nodales de rosa a diferentes concentraciones de NaClO y tiempos de inmersión.....	42
<b>Tabla 7</b>	Porcentaje de necrosis en la fase de establecimiento de segmentos nodales de rosa a diferentes concentraciones de NaClO y tiempos de inmersión.....	44
<b>Tabla 8</b>	Porcentaje de viabilidad en la fase de establecimiento de segmentos nodales de rosa a diferentes concentraciones de NaClO y tiempos de inmersión.....	45
<b>Tabla 9</b>	Correlación del porcentaje de contaminación y necrosis con la viabilidad de segmentos nodales de rosa en la fase de establecimiento. ....	46
<b>Tabla 10</b>	Número de brotes por explante de rosa en la fase de multiplicación a diferentes concentraciones de ANA y subcultivos. ....	48
<b>Tabla 11</b>	Longitud promedio (mm) de los brotes de rosa en la fase de multiplicación a diferentes concentraciones de ANA y subcultivos. ....	50
<b>Tabla 12</b>	Efecto de las auxinas en el porcentaje de enraizamiento de brotes de rosa, evaluado a las 4 semanas de cultivo. ....	52
<b>Tabla 13</b>	Efecto de las auxinas en el número de raíces por brote de rosa, evaluado a las 4 semanas de cultivo. ....	54
<b>Tabla 14</b>	Efecto de las auxinas en el porcentaje de supervivencia de brotes de rosa, evaluado a las 4 semanas de cultivo. ....	55

<b>Tabla 15</b> Correlación del porcentaje de enraizamiento y número de raíces por explante con la supervivencia de los brotes en la fase de enraizamiento. ....	56
--	----

### Listado de figuras

<b>Figura 1</b> Ilustración de la morfología del rosal. ....	23
<b>Figura 2</b> Propagación de rosas por germinación de semillas.....	24
<b>Figura 3</b> Propagación de rosas por esquejes.....	25
<b>Figura 4</b> Propagación de rosas por brotación en T.....	26
<b>Figura 5</b> Porcentaje de contaminación para cada concentración de NaClO y tiempos de inmersión, evaluado a las 4 semanas.....	43
<b>Figura 6</b> Porcentaje de necrosis para cada concentración de NaClO y tiempos de inmersión, evaluado a las 4 semanas.....	44
<b>Figura 7</b> Porcentaje de explantes viables y no viables para cada concentración de NaClO y tiempos de inmersión, evaluado a las 4 semanas.....	46
<b>Figura 8</b> Porcentaje de contaminación, necrosis y viabilidad para cada concentración de NaClO y tiempos de inmersión, evaluado a las 4 semanas.....	47
<b>Figura 9</b> Número de brotes por explante de rosa en la fase de multiplicación de a diferentes concentraciones de ANA y subcultivos.....	49
<b>Figura 10</b> Brotes de rosa en la fase de multiplicación después de ocho semanas de cultivo a diferentes concentraciones de ANA: (a) 0, (b) 0.01, (c) 0.05 y (d) 0.1 mg/L. ...	49
<b>Figura 11</b> Brotes de rosa en la fase de multiplicación a diferentes concentraciones de ANA: (a y b) 0 mg/L, (c y d) 0.1 mg/L; y etapas de cultivo (a y c) primer subcultivo, (b y d) segundo subcultivo.....	51
<b>Figura 12</b> Longitud promedio (mm) de los brotes de rosa en la fase de multiplicación a diferentes concentraciones de ANA y subcultivos.....	51

<b>Figura 13</b> Porcentaje de explantes enraizados y no enraizados de rosa para cada combinación probada de auxinas, evaluado a las 4 semanas. ....	53
<b>Figura 14</b> Brotes de rosa en la fase de enraizamiento a las cuatro semanas de cultivo para cada combinación probada de auxinas (mg/L): (a) ANA (0.1), (b) ANA (0.1) + IBA (0.25) y (c) ANA (0.1) + IBA (0.5). ....	53
<b>Figura 15</b> Número promedio de raíces/explante de rosa para cada combinación probada de auxinas, evaluado a las 4 semanas de cultivo. ....	54
<b>Figura 16</b> Porcentaje de enraizamiento, número de raíces por explante y tasa de supervivencia de los brotes de rosa para cada combinación probada de auxinas, después de 4 semanas de cultivo. ....	56

### Listado de abreviaturas

**2,4-D:** ácido 2,4-diclorofenoxiacético

**2iP:** 6-( $\gamma,\gamma$ -dimetilalilamino)purina

**AG<sub>3</sub>:** ácido giberélico

**AIA:** ácido 3-indol acético

**ANA:** ácido 1-naftalenacético

**ANOVA:** análisis de varianza

**BA:** bencil adenina

**cv:** cultivated variety

**DE:** desviación estándar

**IBA:** ácido 3-indol butírico

**KIN:** kinetina

**MS:** Murashige y Skoog

**NaClO:** hipoclorito de sodio

**pH:** potencial de hidrógeno

**RCV:** Reguladores de crecimiento vegetal

## Resumen

Las rosas son una de las plantas ornamentales más importantes económicamente. Aunque la propagación por medios vegetativos es una técnica predominante en la rosa, no asegura plantas sanas y libres de enfermedades. Además, la dependencia de la temporada y las lentas tasas de multiplicación son algunos factores limitantes en la propagación convencional. En este contexto, la presente investigación tuvo como objetivo implementar un protocolo de cultivo *in vitro* de rosas de corte (*Rosa hybrida* L.) a partir de segmentos nodales para la propagación masiva de plantas. En primer lugar, se estableció un protocolo de desinfección de segmentos nodales mediante el cual se obtuvo un 62.2 % de explantes viables a través de la combinación de hipoclorito de sodio al 2% v/v y 10 minutos de aplicación. Posteriormente, se determinó que el ácido 1-naftalenacético (ANA) no presenta un efecto significativo respecto al índice de multiplicación; sin embargo, una concentración creciente de ANA mejoró la elongación de brotes de rosa alcanzando una longitud promedio mayor a los 16 mm durante dos subcultivos consecutivos en medio suplementado con 0.1 mg/L de ANA y 2 mg/L de bencil adenina (BA). Finalmente, se estableció que la combinación de 0.1 mg/L de ANA con 0.5 mg/L de ácido 3-indol butírico (IBA) en un medio a la mitad de la concentración de sales de Murashige y Skoog (MS), tiene un efecto sinérgico en comparación con la aplicación individual de ANA durante el enraizamiento *in vitro*, logrando un 88.89% de brotes enraizados, 4.78 raíces por plántula y una tasa de supervivencia del 88.89% al final de la fase de enraizamiento.

### Palabras clave:

- **ROSA HYBRIDA**
- **MICROPROPAGACIÓN**
- **REGULADORES DE CRECIMIENTO**



### **Abstract**

Roses are one of the most economically important ornamental plants. Although propagation by vegetative means is a predominant technique in roses, yet it does not ensure and disease-free plants. Moreover, dependence on season and slow multiplication rates are some limiting factors in conventional propagation. In this context, the present research aimed to implement a protocol for *in vitro* culture of cut roses (*Rosa hybrida* L.) from nodal segments for mass plant propagation. First, a protocol for disinfection of nodal segments was established using a combination of 2% v/v sodium hypochlorite and 10 minutes of application, and 62.2% viable explants were obtained. Subsequently, the results shown that 1-naphthaleneacetic acid (NAA) had no significant effect on the multiplication rate; however, an increasing concentration of NAA improved the elongation of rose shoots reaching an average length greater than 16 mm during two consecutive subcultures in medium supplemented with 0.1 mg/L NAA and 2 mg/L benzyl adenine (BA). Finally, it was established that the combination of 0.1 mg/L NAA with 0.5 mg/L 3-indole butyric acid (IBA) in medium at half the concentration of Murashige and Skoog (MS) salts, has a synergistic effect compared to the individual application of NAA during *in vitro* rooting, achieving 88.89% of rooted shoots, 4.78 roots per plantlet and a survival rate of 88.89% at the end of rooting phase.

#### **Key words:**

- ***ROSA HYBRIDA***
- ***MICROPROPAGATION***
- ***GROWTH REGULATORS***

## Capítulo I: Introducción

### Formulación del problema

La rosa es uno de los cultivos comerciales de flores cortadas más importantes. Con una extensa variedad de tamaños, formas de botón, colores y tonos; su notable plasticidad se refleja en la demanda de los consumidores (Yong, 2004). En 2019, Ecuador se posicionó como el tercer exportador de flores cortadas a nivel mundial con una participación del 9.86% en el mercado, solo por detrás de Colombia y Países Bajos (The Observatory of Economic Complexity, 2020). La rosa ecuatoriana es reconocida internacionalmente por su calidad y se diferencia por su tallo largo y fuerte, follaje abundante y botones grandes y apretados en una amplia gama de cultivares (Navarrete, 2018). Para 2020, las exportaciones de rosas representaron 591 millones de dólares para el sector floricultor de Ecuador, constituyendo 71% del total de flores, donde Estados Unidos se mantuvo como principal mercado de exportación con el 35%, seguido de Rusia con el 17% y en tercer lugar Países Bajos con el 11% (Expoflores, 2021).

En campo, los rosales se propagan por diferentes métodos vegetativos como: esqueje, injerto, acodo y semilla. Dado que el cultivo por acodo es limitado y la semilla se emplea principalmente para generar nuevas variedades, a nivel comercial la rosa se reproduce en su mayoría por injerto (Yong, 2004). Esta técnica consiste en implantar una yema de la variedad de interés, en el tallo del patrón o portainjerto (Hartmann *et al.*, 2013). Sin embargo, la injertación tiene algunas limitaciones como la compatibilidad, dado que los injertos incompatibles pueden no formar una unión o la unión puede ser débil. Una unión deficiente da como resultado plantas que crecen mal, se rompen o finalmente mueren (Rothenberger & Starbuck, 2005). Otra desventaja es la necesidad de personal capacitado y mayor espacio en invernadero, lo cual implica un aumento en los costos de producción (Fainstein, 1997).

Además, la propagación por vías vegetativas no asegura plantas sanas y libres de enfermedades, depende de las condiciones climáticas y tiene bajas tasas de multiplicación (Pati *et al.*, 2010).

### **Justificación del problema**

La industria de la floricultura ecuatoriana demanda a los productores la aplicación de tecnologías y sistemas de automatización que les permitan reducir los costos de producción y su impacto ambiental. En ese contexto, la implementación de protocolos de propagación *in vitro* tiene amplias ventajas para el productor de rosas, ya que permite una rápida multiplicación de nuevas variedades de rosa libres de enfermedades, en un período de tiempo relativamente corto (Loyola & Ochoa, 2018). De igual manera, presenta la ventaja de generar propágulos durante todo el año, cultivando una gran cantidad de plantas en un espacio reducido, controlando nutrientes y factores ambientales de manera precisa y reduciendo los costos en comparación con la reproducción asexual en invernadero (Pierik, 1990).

Además, las plantas de rosa micropropagadas son apropiadas para la producción de flores cortadas ya que se ramifican mejor, son más compactas y en algunos casos producen más flores (Pati *et al.*, 2006). Asimismo, las rosas enanas producidas por cultivo de tejidos utilizadas para la generación de plantas en macetas, tienen una tasa de desarrollo más rápida, una floración temprana y un mayor número de tallos laterales que las plantas entregadas tradicionalmente (Dubois *et al.*, 1988).

Estas características solucionan la mayoría de problemas asociados con las técnicas de reproducción tradicional, como: el control fitosanitario con plaguicidas, extensiones de terreno limitadas y gasto de recursos energéticos e hídricos. Sin embargo, varios estudios han demostrado la influencia del genotipo en la propagación *in vitro* en diferentes cultivares de *Rosa hybrida* (Horn, 1992; Khosh-Khui & Sink, 1982a, 1982b). Esto último resulta un inconveniente cuando el objetivo es la multiplicación de

nuevas variedades seleccionadas de un proceso de hibridación. En ese caso, es necesario establecer un proceso general para el cultivo, ajustado para varios genotipos, y que sirva de base para la posterior optimización de acuerdo al cultivar (Horn, 1992). Según lo expuesto, el presente proyecto tiene como finalidad implementar un protocolo de cultivo *in vitro* de rosas de corte (*Rosa hybrida* L.) a partir de segmentos nodales para la propagación masiva de plantas.

## **Objetivos**

### ***Objetivo General***

- Implementar un protocolo de cultivo *in vitro* de rosas de corte (*Rosa hybrida* L.) a partir de segmentos nodales para la propagación masiva de plantas.

### ***Objetivos Específicos***

- Estandarizar un protocolo de desinfección para el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Rosa hybrida* L.
- Evaluar el efecto de la concentración de ácido 1-naftalenacético durante la multiplicación de brotes *in vitro* de *Rosa hybrida* L.
- Establecer un medio de cultivo óptimo para la fase de enraizamiento de plántulas *in vitro* de *Rosa hybrida* L.

## Capítulo II: Marco teórico

### Aspectos generales del rosal

#### *Distribución botánica y taxonomía*

El género *Rosa*, miembro de la familia Rosaceae, comprende más de 200 especies, en su mayoría arbustos espinosos con tallos erguidos o trepadores (Wissemann, 2003). Distribuido ampliamente en los hábitats templados y en las zonas montañosas tropicales del hemisferio norte (Debener & Linde, 2009), la mayoría de las especies silvestres de rosa se encuentran en Asia, mientras que Europa y América del Norte albergan aproximadamente una cuarta parte cada una (Fougère-Danezan *et al.*, 2015). Debido a la homogeneidad en la morfología y el impacto humano de la hibridación de rosas, las especies de este género son difíciles de identificar (Wissemann, 2003). En la actualidad, resultado del cruzamiento y selección a nivel comercial, se estima que existen entre 30 000 y 35 000 variedades de rosas cultivadas que suelen denominarse como *Rosa hybrida* (Gudin, 2003).

Según ITIS (2011), la clasificación taxonómica del rosal basada en el consenso científico disponible se presenta en la Tabla 1.

**Tabla 1**

*Clasificación taxonómica de la rosa*

<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Tracheophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Rosales
<b>Familia</b>	Rosaceae
<b>Género</b>	<i>Rosa</i> L. – rosa silvestre, rosa
<b>Especie</b>	<i>Rosa</i> sp. (híbrida)

*Nota.* Adaptado de *Rosa* L., por Integrated Taxonomic Information System, 2011, ITIS.

Cultivadas durante más de 5 000 años (Bendahmane *et al.*, 2013), las rosas son económicamente importantes como arbustos ornamentales y flores cortadas, así como para perfumes, cosméticos, gastronomía e investigación farmacéutica (Akram *et al.*, 2020; Cutler, 2003; Mármol *et al.*, 2017).

### ***Morfología del rosal***

Los rosales comprenden cientos de especies de arbustos espinosos que también pueden tener un hábito trepador o rastrero (Harden, 2000). Así, el género *Rosa* agrupa a plantas de aspecto diverso, desde los 15 cm de altura hasta trepadoras que llegan a los 12 m (Yong, 2004).

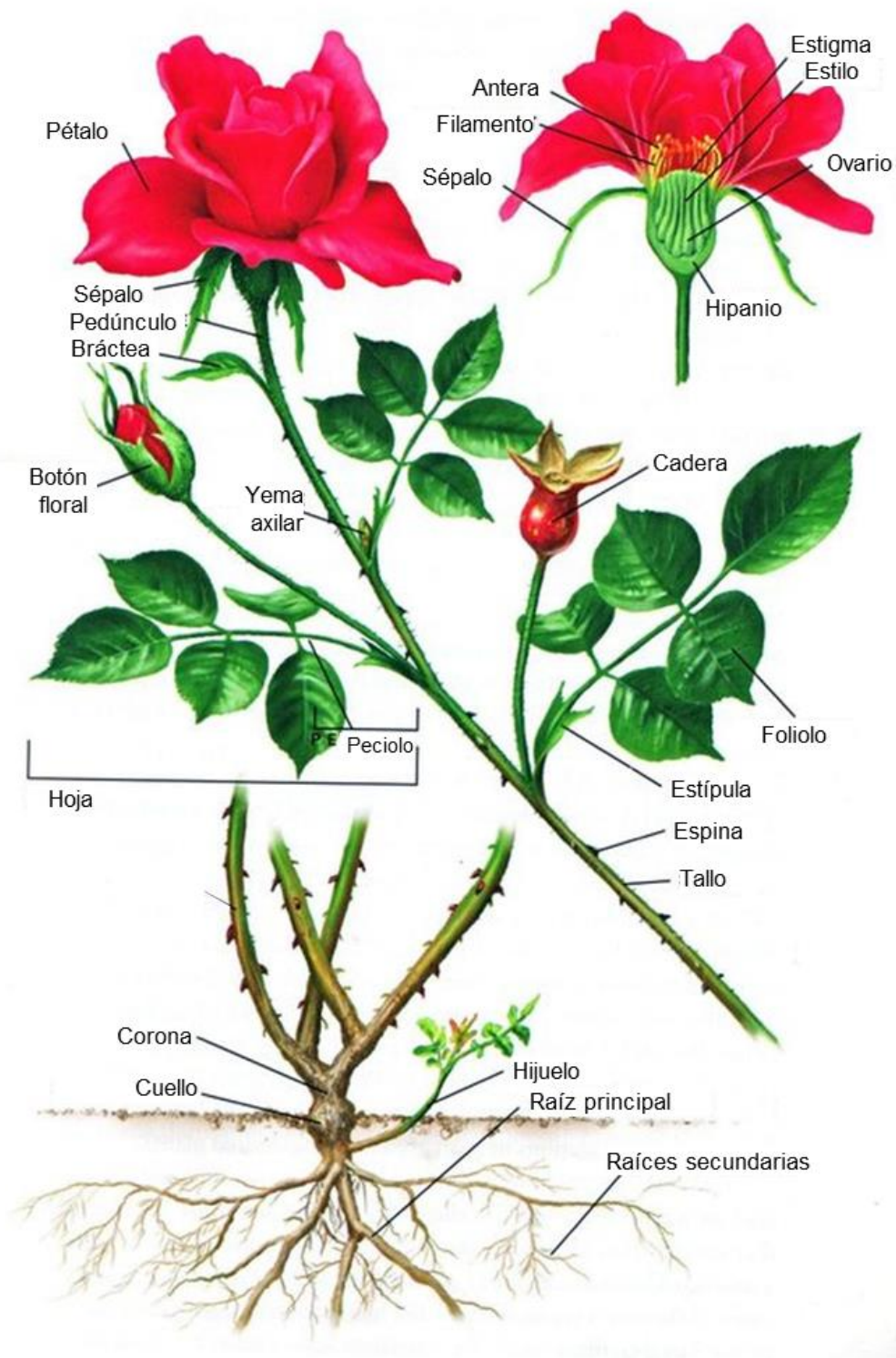
La rosa posee raíz pivotante, con tallos leñosos provistos de espinas que suelen estar más densamente distribuidas en el extremo proximal (basal) del tallo. Las hojas son compuestas en distribución alterna, en su mayoría de forma pinnada e impar. En la base de cada raquis hay estructuras llamadas "estípulas" que están estrechamente adheridas (Torre, 2003). A excepción de unas pocas especies en el sudeste asiático, que son perennes, la gran mayoría de los rosales son de hoja caduca (Fainstein, 1997).

Las flores son solitarias o en corimbos. El cáliz tiene cinco lóbulos, simples o compuestos, y se inserta en la parte superior de un tubo carnoso redondeado o en forma de pera (Nagar *et al.*, 2007). Los pétalos y sépalos son generalmente cinco (*R. sericea* solo tiene cuatro), pero hay muchos más en algunos cultivares. Debajo de los pétalos, tiene un hipantio (receptáculo) profundo, en cuyo interior hay muchos carpelos libres (gineceo apocarposo) (Chimonidou, 2003). Cada carpelo tiene un ovario superior encerrado por el hipantio y los estilos sobresalen a través de la abertura en la parte superior del hipantio (Nagar *et al.*, 2007).

El fruto de la rosa es una "cadera" formada por el carnoso receptáculo. Dentro de la cadera hay varios aquenios que contienen una única semilla (Nagar *et al.*, 2007; Yong, 2004). La mayoría de las características descritas pueden apreciarse en la Figura 1.

**Figura 1**

*Ilustración de la morfología del rosal.*



*Nota.* Adaptado de *Anatomy of a rose* [Ilustración], por N. J. Freiherr, 2019, Pinterest.

### **Formas de propagación vegetativa**

Las rosas se propagan tanto por semillas como por otros métodos vegetativos como esqueje, acodo, brotación e injerto (Fainstein, 1997).

**Semilla.** Los fitomejoradores suelen utilizar semillas, obtenidas de frutos maduros, para el desarrollo de nuevos cultivares (Figura 2). Sin embargo, comercialmente las variedades no se propagan por este método, porque la germinación a menudo es problemática y la progenie derivada de semillas tienen características que difieren de los parentales (Yong, 2004).

Las plántulas, germinadas a partir de semillas, también se utilizan como material para injertos y brotes. Las plántulas de rosas tienden a florecer incluso cuando son muy jóvenes y luego se obstaculiza su crecimiento. Por lo tanto, para obtener plantas grandes y resistentes, es conveniente cortar los cogollos en una etapa muy temprana (Nagar *et al.*, 2007).

### **Figura 2**

*Propagación de rosas por germinación de semillas*



*Nota.* Tomado de *How to grow roses from seed*, 2011, The Garden of Eaden.

**Esquejes.** Esta técnica de propagación ha alcanzado gran aceptación debido a su sencillez y se fundamenta por la capacidad que presentan ciertas partes de una planta para regenerar todos sus órganos bajo condiciones específicas (Hartmann *et al.*, 2013). Los esquejes de rosa pueden ser de tallo o raíz, aunque es preferible emplear

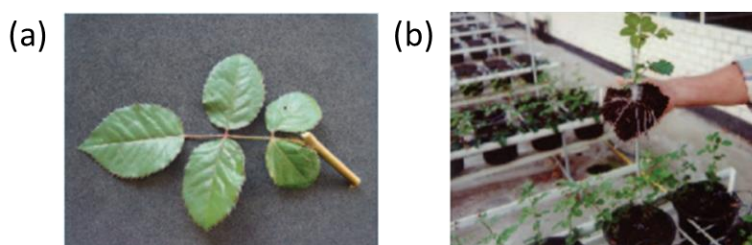


porciones de tallo de nodos simples, dobles o triples (Figura 3). Generalmente se escoge este último ya que hay mayores posibilidades de obtener más brotes y una mejor formación de raíces (Nagar *et al.*, 2007).

Existen factores externos e internos que influyen en el rendimiento de la propagación de rosas a partir de esquejes. Entre los primeros, el manejo de las plantas madre, la morfología del tallo, cantidad de follaje y las condiciones ambientales durante el enraizamiento han sido ampliamente estudiados (Costa & Van de Pol, 2003). Por otra parte, las relaciones de azúcares, agua, nutrientes y hormonas están asociados a los factores endógenos o internos.

### Figura 3

*Propagación de rosas por esquejes.*



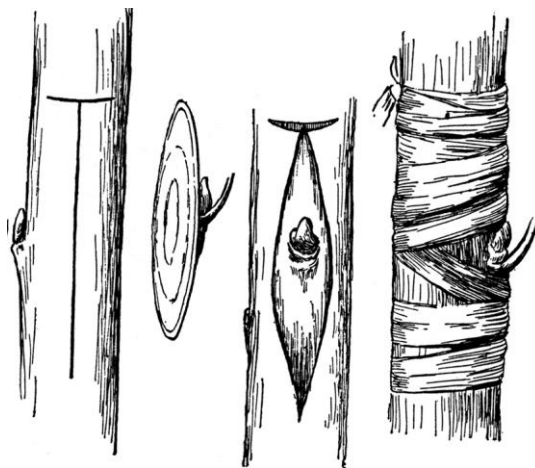
*Nota.* (a) Esqueje de madera blanda de un solo nodo, (b) Planta joven enraizada una semana después de la plantación en invernadero. Tomado de *PROPAGATION | Own-Rooted Cuttings* (p.608), por J. Costa, & P. Van de Pol, 2003, Encyclopedia of Rose Science.

**Injerto.** Es un método en el que partes de diferentes plantas se combinan físicamente y continúan creciendo como una sola planta (Hartmann *et al.*, 2013). En el caso de la rosa, el método más común de injerto se conoce como brotación en T debido a la forma del corte que se hace en el patrón (Figura 4). Esencialmente, consiste en cortar una sección que contiene la yema de la variedad de interés e insertarlo en el corte en T hecho en la corteza del portainjerto. Luego, la unión de la yema se envuelve firmemente y, durante un período de tiempo, los sistemas vasculares del patrón y la

yema se combinarán. Finalmente, la yema romperá la latencia y se convertirá en un brote (Fainstein, 1997; Hartmann *et al.*, 2013). Es el método de propagación más empleado a nivel comercial.

#### **Figura 4**

*Propagación de rosas por brotación en T.*



*Nota.* Adaptado de *Fundamentals of Botany*, por C. Stuart Gager, 1916, P. Blakiston's Son & Co.

#### ***Importancia del cultivo de rosa en Ecuador***

El éxito de la rosa ecuatoriana se reduce a su posición geográfica que confiere a los cultivos luz solar durante todo el año, acompañado de una diversidad de climas y suelos que permiten obtener rosas con tallos largos, botones grandes y presentaciones únicas de color (Conefrey, 2015). El cultivo comercial de rosas en Ecuador inicia en la década de los 80's, sin embargo no es hasta 1991, con la Ley de Preferencias Comerciales Andinas, que la industria de la floricultura experimentó un crecimiento vertiginoso de las exportaciones adquiriendo notoriedad en el mercado internacional (Anderson, 2003). En correspondencia, la participación de las flores en las exportaciones no petroleras creció de un 1% en 1990 al 6% para 2020, siendo la rosa la principal flor en volumen exportado.

En 2020, la superficie cultivada con rosas alcanzó las 3 812 hectáreas, constituyendo el 73% de las tierras labradas con flores (INEC, 2021). La participación de la rosa en las exportaciones de 2020 constituyó el 71% del total de flores, generando ingresos por 591 millones de dólares (Expoflores, 2021). Además, según la Corporación Financiera Nacional (CFN) el sector florícola del país generó 25 177 plazas de empleo directas en 2019, provistas por 181 empresas en total (CFN, 2020).

Sin embargo, los desafíos que plantea la saturación de la oferta de flores debido al incremento de la producción en países africanos, la volatilidad del mercado y las demandas de los compradores europeos, exigiendo mejoras en la protección ambiental y social de los productores; demandan cambios dentro del sector floricultor ecuatoriano (Paredes, 2019). En este contexto, es necesario la implementación de tecnologías de cultivo que mejoren la competitividad y volumen de producción.

## **Cultivo de tejidos vegetales**

### ***Generalidades***

El cultivo de tejidos vegetales es un término amplio que estudia el crecimiento de cualquier parte de una planta (células, tejidos u órganos) en medios artificiales, condiciones asépticas y ambientes controlados (Loyola & Ochoa, 2018). La técnica de clonación *in vitro* de células individuales demostró el hecho de que las células somáticas, en condiciones apropiadas, pueden diferenciarse en una planta completa. Este potencial de una célula para crecer y desarrollar un organismo multicelular se denomina totipotencia celular (Thorpe, 2007). Este potencial de células o tejidos para formar todo tipo de células y regenerar una planta es el principio básico del cultivo de tejidos (Pierik, 1990).

Sin duda, la micropropagación o propagación clonal *in vitro* es una de las aplicaciones comerciales más extendidas del cultivo de tejidos. Esta herramienta se destina especialmente a especies que se propagan asexualmente en campo, como es

el caso de los cultivares de rosa (Roberts & Schum, 2003). El método más utilizado para micropropagar rosas se basa en la multiplicación de yemas y brotes, que es el equivalente *in vitro* de la propagación *in vivo* a partir de esquejes. También es posible producir plantas a mediante la formación de brotes adventicios y embriones somáticos, sin embargo, las aprehensiones de inestabilidad genética y la mayor complejidad han desalentado el uso generalizado de estos métodos en la micropropagación de rosas (Castilla, 2005; Roberts & Schum, 2003).

Según Altman & Loberant (2003), el proceso de micropropagación se puede dividir en cinco etapas diferentes:

Fase 0: Selección y cultivo de plantas madre. Implica la propagación vegetativa de plantas que no presenten síntomas de enfermedades con las características de interés. El nivel de cuidado requerido de las plantas se consigue mejor en un invernadero, en el que se toman medidas preventivas contra plagas y patógenos.

Fase I: Establecimiento del cultivo. El propósito de esta etapa es iniciar cultivos axénicos. Implica la selección de explantes, desinfección y cultivo en condiciones asépticas.

Fase II: Multiplicación. Las masas de tejidos se subcultivan repetidamente en condiciones asépticas en nuevos medios de cultivo que fomentan la proliferación de propágulos. El cultivo puede suministrar brotes para las siguientes fases de propagación, así como el material necesario para mantener el stock.

Fase III: Enraizamiento. Esta etapa está diseñada para inducir alargamiento y desarrollo radicular transfiriendo el explante a un medio de cultivo con una baja concentración de sales y citoquininas en conjunción con un aumento de las auxinas exógenas. Además, no todas las especies requieren una etapa de enraizamiento ya que pueden generar raíces en el medio de multiplicación de forma simultánea (Roca & Mroginski, 1991).

Fase IV: Aclimatación. Las plantas micropropagadas son vulnerables a la transferencia a condiciones *ex vitro*, por lo que es necesario un acondicionamiento gradual al entorno. Esta fase es crítica, pues las plántulas son susceptibles a la pérdida excesiva de agua, tienen un sistema fotosintético deficiente y dependen inicialmente de las reservas de alimento almacenado (Altman & Loberant, 2003; Roca & Mroginski, 1991).

### **Composición del medio de cultivo**

Los medios de cultivo deben aportar todos los elementos y nutrientes esenciales necesarios para el crecimiento de las plantas *in vitro* (Pierik, 1990). La selección o desarrollo de un medio de cultivo es un paso esencial en cualquier proyecto de cultivo de tejidos. Los componentes de los medios utilizados para el crecimiento de explanes son agua (agua destilada o desionizada), sales minerales (macro y micronutrientes), sustancias orgánicas (vitaminas y fuente de carbono), reguladores del crecimiento (citoquininas, auxinas, giberelinas y otros reguladores) y agente gelificante (por ejemplo, agar) (Altman & Loberant, 2003).

**Sales inorgánicas.** Las sales minerales son componentes esenciales del medio de cultivo dado que influyen en el crecimiento de los explanes. Los macronutrientes son elementos cuya concentración necesaria es mayor que 0.5 mM, en contraste con los micronutrientes con valores menores a 0.05 mM (Razdan, 2003). Los macronutrientes comprenden elementos como: nitrógeno (N), potasio (K), fósforo (P), azufre (S), magnesio (Mg), y calcio (Ca); que se incorporan al medio de cultivo en forma de sales (Altman & Loberant, 2003).

Después del carbono, el N es el elemento requerido en mayor cantidad por las plantas; desempeña un papel central en el metabolismo como componente de proteínas, ácidos nucleicos, clorofila, coenzimas, fitohormonas y metabolitos secundarios. En el medio de cultivo se absorben como iones amonio o nitrato (Tripathi

*et al.*, 2014). El P es un elemento estructural de los ácidos nucleicos y juega una función clave en la transferencia de energía como componente de los fosfatos de adenosina. El azufre se absorbe en forma de sulfato y se asimila en aminoácidos que contienen S, que se utilizan para sintetizar enzimas y coenzimas. El papel principal del K es la osmorregulación, que es importante para la extensión celular y el movimiento de solutos y estomas. El Mg es un componente de la clorofila y es necesario para la síntesis de proteínas (Taiz & Zeiger, 2010).

Los microelementos se encuentran en pequeñas cantidades, pero son necesarios para el crecimiento de células y tejidos. Estos son: hierro (Fe), zinc (Zn), manganeso (Mn), boro (B), cobre (Cu), cobalto (Co), molibdeno (Mo), yodo (I) y cloro (Cl) (Razdan, 2003). Entre ellos, la presencia de Fe y Mg es crítica para la síntesis de clorofila, la cadena de transporte de electrones de la respiración celular y la fotosíntesis, además de ser un cofactor enzimático (Taiz & Zeiger, 2010).

Existe una gran variedad de combinaciones de macro y micronutrientes que es dependiente de la especie. El medio de cultivo más utilizado se describe en Murashige & Skoog (1962) (medio MS), debido a que la mayoría de las plantas reaccionan favorablemente en este medio nutritivo. Se clasifica como un medio con alto contenido de sales en comparación con muchas otras formulaciones, con contenidos elevados de nitrógeno, potasio y algunos de los micronutrientes, en particular boro y manganeso (Cohen, 1995). Sin embargo, esta solución nutritiva no siempre es necesariamente óptima para el crecimiento y desarrollo de plantas *in vitro* (Pierik, 1990).

Varios autores han examinado la capacidad de los explantes de rosa para producir brotes y desarrollar raíces en diferentes medios. En su mayoría, llegaron a la conclusión de que se obtuvo una proliferación óptima de los brotes en sales MS de fuerza completa (Davies, 1980; Hasegawa, 1979), mientras que el enraizamiento mejoró

reduciendo la concentración de sales (Khosh-Khui & Sink, 1982a; Kim *et al.*, 2003; Skirvin & Chu, 1979).

**Fuente de carbono.** Los carbohidratos añadidos al medio de cultivo aumentan el potencial osmótico y aportan energía para el metabolismo del explante (Razdan, 2003). La adición de una fuente de carbono en cualquier medio nutritivo es fundamental para el crecimiento y desarrollo *in vitro* de muchas especies, debido a que el crecimiento se produce en condiciones inadecuadas para la fotosíntesis o sin fotosíntesis (en oscuridad). Normalmente, los tejidos verdes no son suficientemente autótrofos en condiciones *in vitro* y dependen de la disponibilidad de carbohidratos en el medio de cultivo (Pierik, 1990).

La sacarosa (2-5% p/v) es la fuente de carbono más utilizada, por varias razones. Es barata, fácilmente disponible, relativamente estable al autoclave y es rápidamente asimilada por las plantas. También se pueden utilizar otros carbohidratos, como glucosa, maltosa y galactosa, así como los polioles glicerol y sorbitol (Fowler, 2010).

Davies (1980), estudió el efecto de la concentración de sacarosa entre 2 y 8% p/v para siete variedades de rosa y concluyó que las mejores respuestas de proliferación y enraizamiento de brotes se obtienen con 4% p/v.

**Reguladores de crecimiento.** Los reguladores del crecimiento vegetal (RCV) son compuestos orgánicos sintetizados natural o artificialmente, que influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Pierik, 1990). La morfogénesis *in vitro* están regulados por la interacción y el equilibrio entre los RCV suministrados en el medio y las sustancias de crecimiento producidas de forma endógena (Razdan, 2003). El equilibrio de estos compuestos depende del objetivo del cultivo *in vitro* (por ejemplo, proliferación de brotes, raíces, callos, entre otros) y de la fase de micropropagación considerada (iniciación, multiplicación o enraizamiento). Con mayor frecuencia se requiere un

equilibrio entre auxina y citoquinina para la formación de brotes y raíces adventicias (Roca & Mroginski, 1991).

Hay varias clases de RCV como: citoquininas, auxinas, giberelinas, etileno, ácido abscísico y otros (Fowler, 2010). Sin embargo, los primeros tres grupos son relevantes dentro de la micropropagación de rosa.

Las citoquininas se derivan de la adenina y desempeñan múltiples funciones dentro de la planta, de las cuales destacan: estimular la división celular, retrasar la senescencia en órganos desprendidos, intervenir en la movilización de nutrientes, maduración del cloroplasto y el control de la morfogénesis (Taiz & Zeiger, 2010). Añadidos al medio de cultivo, estos compuestos rompen la dominancia apical y liberan las yemas laterales del letargo (Roca & Mroginski, 1991). Las citoquininas más comúnmente utilizadas son kinetina (KIN), 6-( $\gamma,\gamma$ -dimetilalilamino)purina (2iP) y bencil adenina (BA) (Pierik, 1990).

Carelli & Echeverrigaray (2002) y Vijaya & Satyanarayana (1991), compararon los efectos de las citoquininas BA, KIN y 2-iP en la propagación *in vitro* de cultivares de *Rosa hybrida*, concluyendo en ambos estudios que BA (2 – 3 mg/L) promueve un mayor número de brotes por explante en comparación con KIN, y 2iP dio resultados intermedios.

Las auxinas son un grupo de reguladores que promueven la elongación y división celular, la formación de raíces adventicias, así como la inhibición de la formación de brotes adventicios y axilares (Pierik, 1990). Además, están involucradas en procesos fisiológicos como la dominancia apical y formación de raíces (Roca & Mroginski, 1991). El ácido 3-indol acético (AIA) es una auxina natural, mientras que el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 3-indol butírico (IBA) y ácido 1-naftalenacético (ANA) se producen sintéticamente, tienen un efecto similar y se utilizan ampliamente dentro del cultivo de tejidos vegetales (Fowler, 2010).



De acuerdo con la mayoría de los estudios publicados sobre el efecto del tipo y concentración de auxinas en la rosa, se deben utilizar concentraciones bajas de este regulador de crecimiento en el medio de cultivo. El enraizamiento de los brotes de rosa se ha mejorado con la suplementación de AIA (considerada una auxina débil) a 1.0 mg/L (Kim *et al.*, 2003), 0.1 mg/L ANA (Rahman *et al.*, 1992) o incluso en ausencia de auxina (Skirvin & Chu, 1979). La combinación de dos tipos de auxinas también se puede utilizar para aumentar la formación de raíces en la rosa. Khosh-Khui & Sink (1982b) encontraron que la mejor combinación para la producción de plantas enraizadas era 0.1 mg/L ANA con 0.05 mg/L de AIA o IBA. La combinación de dos auxinas fue más efectiva para la formación de raíces que cualquiera de las auxinas solas.

Las giberelinas son un grupo de compuestos usados ocasionalmente en el cultivo *in vitro* de plantas. En algunas especies, estos RCV son necesarios para potenciar y en otras para inhibir el crecimiento (Razdan, 2003). El ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) es la giberelina más utilizada. Induce el alargamiento de los entrenudos y el crecimiento de meristemas o yemas *in vitro* (Pierik, 1990). La inclusión de bajas concentraciones de GA<sub>3</sub> (0.1 – 0.25 mg/L) en el medio ha demostrado tener efectos positivos en la multiplicación de brotes de rosa (Rout *et al.*, 1990).

**Agente gelificante.** Los agentes gelificantes son comúnmente utilizados para la preparación de medios semisólidos o sólidos, y permiten el cultivo de tejidos en posición estática. El agar es un polisacárido extraído de especies de algas rojas que se recolectan del mar y es usado ampliamente debido a que forma geles estables a las temperaturas de esterilización e incubación, no es degradado por enzimas de las plantas y se solidifican a los pH típicos empleados en el cultivo de tejidos vegetales (Razdan, 2003).

Normalmente se requiere entre 6 – 8 g/L para la propagación de rosa (Pati *et al.*, 2006). Un aumento en la concentración de agar reduce la aparición de síntomas de hiperhidratación en las plantas; sin embargo, la tasa de propagación puede reducirse drásticamente (Debergh, 2003). Por otro lado, Rahman *et al.* (1992) informaron que el porcentaje de enraizamiento de rosa disminuyó al aumentar la concentración de agar (de 6 a 15 g/L), con una inducción óptima a 6 g/L de agar.

### **Factores físicos**

La respuesta de los explantes al cultivo *in vitro* está influenciada por factores físicos como: luz, temperatura y humedad.

La luz es un factor que controla el crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que está relacionada con la fotosíntesis, el fototropismo y la morfogénesis (Taiz & Zeiger, 2010). Las tres características de la luz que influyen en el crecimiento *in vitro* son la longitud de onda, la densidad de flujo y la duración de la exposición a la luz o fotoperíodo (George *et al.*, 2008). Horn (1992) menciona que una densidad de flujo de 1 a 3 klux ( $16\text{--}46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) es suficiente para la proliferación de brotes en rosa. Por otro lado, un fotoperíodo de 16 h de luz mostró un mejor crecimiento y multiplicación de brotes de rosa (Bressan *et al.*, 1982).

La temperatura es una variable decisiva durante las etapas de micropropagación de rosa. Leyhe & Horn (1994) registraron la formación óptima de brotes y raíces a 21 °C para diferentes cultivares de *R. hybrida*. Por otra parte, Rahman *et al.* (1992) afirmó que una temperatura de 28 °C mejoró el enraizamiento *in vitro* de rosa. Sin embargo, muchos investigadores han utilizado una temperatura de alrededor de 25 °C para la multiplicación y enraizamiento de brotes (Pati *et al.*, 2006).

En general, se acepta que la humedad relativa en el recipiente de cultivo *in vitro* es aproximadamente del 98 al 100%. Como consecuencia, las plantas *in vitro* tienen más transpiración y anomalías anatómicas en condiciones *ex vitro* lo que puede resultar

en una alta tasa de mortalidad durante la aclimatación (Altman & Loberant, 2003). Por ello, se han probado diferentes métodos para reducir la humedad relativa del aire dentro del recipiente, por ejemplo, un estudio realizado con brotes de vid probando diferentes diámetros de orificios en el cierre del recipiente mostró que los brotes cultivados en recipientes ventilados eran más altos que los brotes cultivados en recipientes sin ventilación y tenían un mayor contenido de clorofila (Gribaudo *et al.*, 2003).

### **Hipótesis**

La concentración de cloro comercial y tiempo de inmersión influyen en el establecimiento de cultivos asépticos de segmentos nodales de *Rosa hybrida* L.

La concentración de ANA en el medio es una variable que afecta sensiblemente las variables de respuesta en la fase de multiplicación de plántulas *in vitro* de *Rosa hybrida* L.

Existe una combinación de auxinas en la cual se presenta un mayor porcentaje de enraizamiento *in vitro* de rosas de corte (*Rosa hybrida* L.).

### Capítulo III: Materiales y métodos

#### Localización del ensayo

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la empresa Conectiflor Andino S.A., ubicado en la provincia de Pichincha, cantón Cayambe, sector Guachalá a una latitud de 0°00'07.1"S y longitud de 78°28'00.3"W.

#### Material vegetal

El material vegetal fue colectado en los predios de la empresa Conectiflor Andino S.A., desde dos locaciones: (1) finca número dos de Rosaprima, ubicada en el sector de Guachalá, cantón Cayambe, provincia de Pichincha o, (2) finca Royal Flowers, situada en la parroquia de Mulaló, cantón Latacunga, provincia de Cotopaxi.

Se recolectaron tallos de varios cultivares de *Rosa hybrida* L. de plantas fenotípicamente sanas, ramas en crecimiento activo a partir de un año de cultivo en invernadero. El material vegetal de la locación 1 fue llevado inmediatamente al laboratorio para su procesamiento; por otro lado, si los tallos provenían de la locación 2 se sumergieron en una solución fungicida 0.6 g/L de Switch® (Syngenta), se envolvieron en papel periódico y transportaron a baja temperatura para impedir la proliferación de microorganismos contaminantes y su desecación.

#### Medios de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue Murashige & Skoog (1962), cuya composición se muestra en la Tabla 2. En todas las fases, el medio MS se suplementó con sacarosa (30 g/L), agar (6 g/L) y reguladores de crecimiento del tipo citoquininas (BA) y auxinas (IBA y ANA) a diferentes concentraciones de acuerdo a la etapa de micropropagación. Adicionalmente, en las etapas de establecimiento y multiplicación se agregó ácido cítrico (0.1 g/L) para evitar la oxidación por compuestos fenólicos (Pati *et al.*, 2006). Previo a la adición del agar se ajustó el pH a 5.8 con KOH o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 N). Se dispensó

10 mL del medio fundido en tubos de ensayo (25 x 15 mm) o 30 mL en frascos de vidrio y esterilizó en autoclave a 121 °C, 1.06 kg/cm<sup>2</sup> durante 15 minutos.

**Tabla 2**

*Composición del medio Murashige & Skoog.*

<b>Macronutrientes</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>
CaCl <sub>2</sub>	332.02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00
KNO <sub>3</sub>	1900.00
MgSO <sub>4</sub>	180.54
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.00
<b>Micronutrientes</b>	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
NaFeEDTA	36.70
H <sub>3</sub> B <sub>3</sub>	6.20
KI	0.83
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16.90
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.60
<b>Vitaminas</b>	
Glicina	2.00
Myo-Inositol	100.00
Ácido nicotínico	0.50
Piridoxina HCl	0.50
Tiamina HCl	0.10

## Condiciones de cultivo

Se incubó los explantes en un cuarto de crecimiento a una temperatura media de  $25 \pm 2$  °C, densidad lumínica de  $28 \pm 5$   $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  de luz blanca de lámparas LED, con un fotoperiodo de 16 h (Senapati & Rout, 2008). Estas condiciones de cultivo se mantuvieron a lo largo de los experimentos, a menos que se indique lo contrario.

## Descripción de los ensayos

### ***Etapa I: Establecimiento in vitro***

**Manejo del material vegetal.** Se procedió a retirar las partes accesorias de los tallos como: espinas, hojas, flores, entre otras. Se cortó segmentos nodales del tercio medio y superior del tallo con una longitud de 1.5 a 2 cm (Pati *et al.*, 2010). Estos segmentos se colectaron en agua destilada hasta comenzar con la desinfección.

**Desinfección.** Se inició con una limpieza en detergente comercial (3% p/v, pH 11.5) en agitación por 20 minutos para remover el polvo e impurezas superficiales, seguido de tres lavados con agua destilada, con una duración de un minuto por lavado. Posteriormente, se aplicó una solución bactericida y fungicida de Bioperac® (ácido peracético 18% y peróxido de hidrógeno 12%) y Celest® 025 FS (fludioxonil 25 g/L) al 0.1% v/v cada uno, por 10 minutos y se enjuagó tres veces con agua destilada estéril. En cámara de flujo laminar, se realizó una inmersión en etanol 70% v/v por un minuto (Attia *et al.*, 2012). Se evaluaron tres concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1, 1.5 y 2% v/v con 0.02% v/v Tween 20 en dos tiempos de exposición (5 y 10 minutos), generando seis tratamientos (Tabla 3). Finalmente se enjuagó tres veces con agua destilada estéril.

**Siembra.** En cámara, se eliminaron las partes oxidadas por la desinfección hasta obtener explantes con una longitud de 1–1.5 cm de longitud previo a su inoculación en el medio de cultivo suplementado con 2 mg/L de BA y 0.1 mg/L de ANA para la inducción de brotes (Khosh-Khui & Sink, 1982a; Skirvin & Chu, 1979).

En la primera etapa se implementó un diseño factorial 3x2 con 15 explantes por cada tratamiento, siendo la unidad experimental un segmento nodal por tubo de ensayo. Cada tratamiento se ejecutó por triplicado.

**Tabla 3**

*Tratamientos aplicados para la desinfección de segmentos nodales.*

Tratamiento	NaClO (% v/v)	Tiempo (minutos)
TD1	1.0	5
TD2	1.0	10
TD3	1.5	5
TD4	1.5	10
TD5	2.0	5
TD6	2.0	10

Las variables de respuesta consideradas fueron: porcentaje de contaminación total, necrosis y viabilidad (explantes supervivientes no contaminados ni necrosados) a las cuatro semanas de cultivo.

### ***Etapa II: Multiplicación***

En la fase se evaluó el efecto de la concentración de ANA (Kim *et al.*, 2003) y el número de subcultivo (Davies, 1980; Salehi, 1995) en la proliferación de brotes en diferentes cultivares. Para ello, los plántulas de la etapa anterior se inocularon en medio suplementado con 2 mg/L de BA (fijado en ensayos preliminares) y diferentes concentraciones de ANA (Tabla 4), con un periodo de cinco semanas entre cada subcultivo (Rout *et al.*, 1990). Entre subcultivos, las plántulas con brotes con una longitud mayor a 0.7 mm se cortaron y se transfirieron por separado.

En esta etapa, se implementó un diseño completamente aleatorizado (DCA) de un factor con cuatro niveles, 15 explantes por cada tratamiento siendo la unidad experimental un frasco con cinco brotes. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

**Tabla 4**

*Tratamientos para evaluar el efecto de la concentración de ANA en la proliferación de brotes de rosa.*

Tratamiento	Concentración de ANA (mg/L)
M1 (Control)	0.00
M2	0.01
M3	0.05
M4	0.10

Las variables de respuesta examinadas fueron el índice de multiplicación (número de brotes por explante) y longitud de los brotes durante dos subcultivos consecutivos.

### ***Etapa III: Enraizamiento in vitro***

En esta etapa se valoró el efecto sinérgico entre las auxinas ANA y diferentes concentraciones de IBA en el enraizamiento *in vitro* de brotes de *Rosa hybrida* (Khosh-Khui & Sink, 1982b). Para ello, explantes con una longitud mayor o igual a 1.5 cm se inocularon en medio con sales de MS a la mitad de concentración, suplementado con 0.1 mg/L de ANA y tres concentraciones de IBA (Tabla 5). Cabe señalar, que en esta etapa los frascos de cultivo se cerraron con tapa durante la incubación, con el objetivo de reducir la luminosidad y consecuentemente mejorar el enraizamiento (Khosh-Khui & Sink, 1982b).

En esta fase, se implementó un diseño completamente aleatorizado (DCA) de un factor con tres niveles, 15 explantes por cada tratamiento siendo la unidad experimental



un frasco con cinco brotes. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Las variables evaluadas fueron el porcentaje de enraizamiento, número de raíces por brote y tasa de supervivencia, después de cuatro semanas de cultivo.

**Tabla 5**

*Tratamientos para el enraizamiento in vitro de brotes de rosa.*

<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración de auxinas (mg/L)</b>
R1	ANA (0.1) + IBA (0.0)
R2	ANA (0.1) + IBA (0.25)
R3	ANA (0.1) + IBA (0.5)

### **Análisis estadístico**

Para las variables continuas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) o su variante no paramétrica en el caso que no cumpla la condición de normalidad (test de Kruskal Wallis) para probar la significancia de las diferencias entre tratamientos. Cuando se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), se computó una prueba de comparación múltiple de medias (test de Tukey). Por otro lado, para la evaluación estadística de frecuencias (por ejemplo, tasa de supervivencia), los datos se analizaron mediante la prueba de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) y se procedió a analizar la correlación entre variables empleando el coeficiente de correlación de Spearman ( $\rho$ ). Para los cálculos se utilizó el software InfoStat v. 2017.1.2 (Di Rienzo *et al.*, 2011).

## Capítulo IV: Resultados

### Etapa I: Establecimiento *in vitro*

En esta fase se evaluaron seis tratamientos de desinfección considerando tres concentraciones de NaClO (1, 1.5 y 2% v/v) y dos tiempos de aplicación (5 y 10 minutos). Dado que las variables de respuesta contaminación, necrosis y viabilidad son dicotómicas, se analizó por separado el efecto de ambos factores.

#### Contaminación

La Tabla 6 resume los porcentajes de contaminación para cada uno de los tratamientos ejecutados. Se puede observar que la combinación de NaClO 1% v/v y 10 minutos tiene el mayor porcentaje de explantes contaminados con el 73.2%, en contraste con el tratamiento que combina NaClO 2% v/v y 10 minutos de exposición que presenta el menor valor con un 35.6 %. Los demás tratamientos poseen porcentajes de contaminación superiores al 45 %.

**Tabla 6**

*Porcentaje de contaminación en la fase de establecimiento de segmentos nodales de rosa a diferentes concentraciones de NaClO y tiempos de inmersión.*

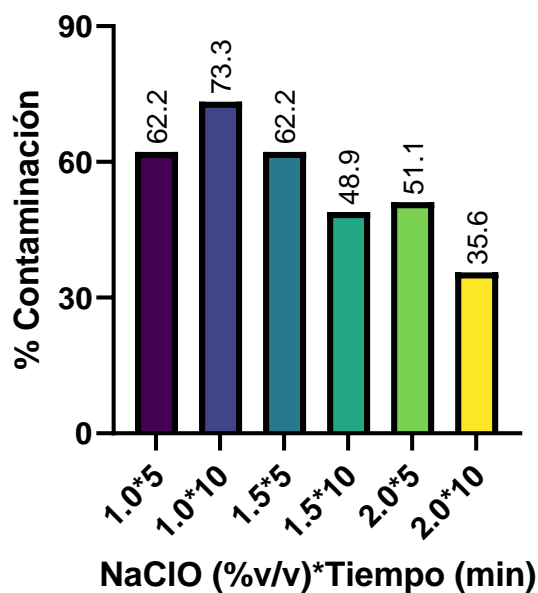
NaClO (% v/v)	Tiempo (minutos)		Influencia del tiempo ( $\chi^2$ )
	5	10	
1.0	62.2	73.3	ns
1.5	62.2	48.9	ns
2.0	51.1	35.6	ns
<b>Influencia del NaClO (<math>\chi^2</math>)</b>	ns	***	

*Nota.* El tamaño muestral para cada tratamiento  $n = 45$ , <sup>ns</sup> no significativo, <sup>\*\*\*</sup> significativo al 1%.

Resultado del test chi-cuadrado se concluye que el porcentaje de contaminación es independiente del tiempo de aplicación para cada concentración de NaClO probada ( $p > 0.05$ ) (Tabla 6). Sin embargo, se observa una marcada disminución en el porcentaje de contaminación según aumenta el tiempo de exposición a las soluciones de NaClO (Figura 5). Por otro lado, cuando el tiempo de inmersión fue 10 minutos, el porcentaje de explantes contaminados es significativamente dependiente de la concentración de NaClO, lo cual coincide con el tratamiento más efectivo en esta etapa y es concordante con la tendencia apreciable en la Figura 5.

### Figura 5

*Porcentaje de contaminación para cada concentración de NaClO y tiempos de inmersión, evaluado a las 4 semanas.*



### Necrosis

En cuanto a la necrosis, se observó que todos los tratamientos evaluados poseen porcentajes similares de explantes que presentaron este fenómeno, con un mínimo del 0% para la combinación de NaClO 1% v/v y 5 minutos de exposición, y un máximo del 4.4% para el tratamiento con NaClO 2% y 10 minutos (Tabla 7).

**Tabla 7**

Porcentaje de necrosis en la fase de establecimiento de segmentos nodales de rosa a diferentes concentraciones de NaClO y tiempos de inmersión.

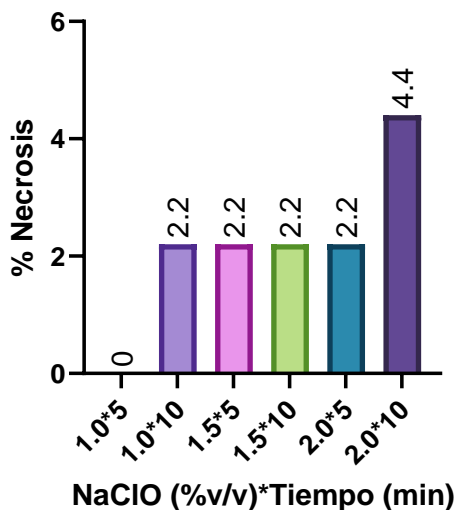
NaClO (% v/v)	Tiempo (minutos)		Influencia del tiempo ( $\chi^2$ )
	5	10	
1.0	0.0	2.2	ns
1.5	2.2	2.2	ns
2.0	2.2	4.4	ns
<b>Influencia del NaClO (<math>\chi^2</math>)</b>	ns	ns	

Nota. El tamaño muestral para cada tratamiento n = 45, <sup>ns</sup> no significativo.

Al analizar la influencia de ambos factores en sus distintos niveles, el test chi-cuadrado develó que ambos son independientes del porcentaje de necrosis ( $p > 0.05$ ) (Tabla 7). Es decir, que ninguno de los tratamientos aplicados está relacionado con la necrosis de los explantes, aún cuando aparentemente para el tiempo de 5 minutos y 2% de NaClO se observe un aumento en el porcentaje, este no es significativo (Figura 6).

**Figura 6**

Porcentaje de necrosis para cada concentración de NaClO y tiempos de inmersión, evaluado a las 4 semanas.



### **Viabilidad**

Con relación a la viabilidad, es decir los explantes no contaminados ni necrosados; se puede apreciar que el menor porcentaje en esta variable se obtuvo en el tratamiento 2 (NaClO 1% v/v y 5 minutos) con un 24.4%, mientras que el tratamiento 6 que combina los niveles más altos de las variables evaluadas (NaClO 2% v/v y 10 minutos) tiene el mayor porcentaje de viabilidad con un 62.2%. El resto de tratamientos presenta valores inferiores al 45% de supervivencia (Tabla 8). Además, en la Figura 7 se puede vislumbrar que el porcentaje de viabilidad aumenta conforme las concentraciones de NaClO y los tiempos de exposición se incrementan.

**Tabla 8**

*Porcentaje de viabilidad en la fase de establecimiento de segmentos nodales de rosa a diferentes concentraciones de NaClO y tiempos de inmersión.*

NaClO (% v/v)	Tiempo (minutos)		Influencia del tiempo ( $\chi^2$ )
	5	10	
1.0	37.8	24.4	ns
1.5	35.6	48.9	ns
2.0	44.4	62.2	*
<b>Influencia del NaClO (<math>\chi^2</math>)</b>	ns	***	

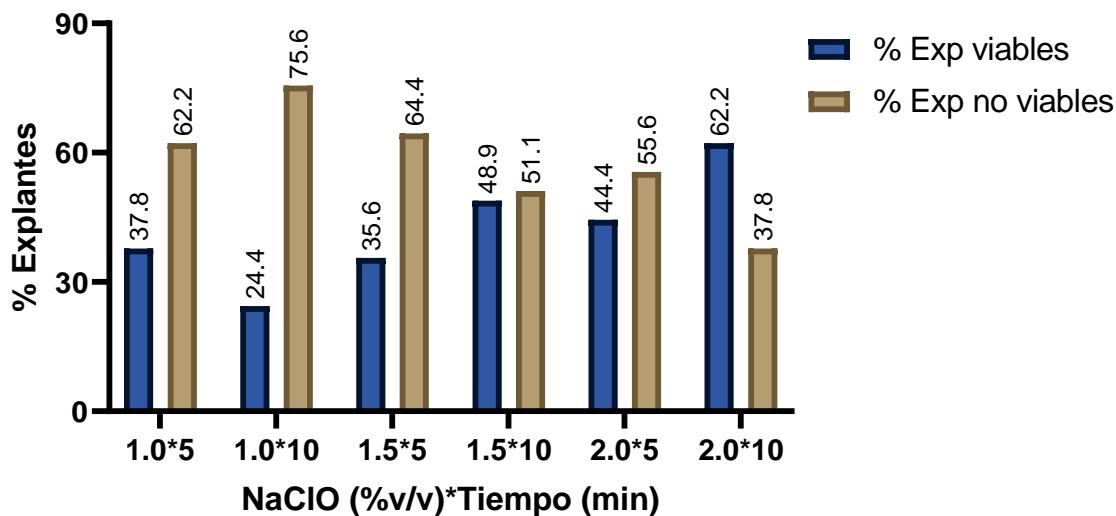
*Nota.* El tamaño muestral para cada tratamiento  $n = 45$ , <sup>ns</sup> no significativo, \* significativo al 10%, \*\*\* significativo al 1%.

Al comparar las frecuencias de supervivencia, se puede discernir que a niveles de 1% y 1.5% v/v de NaClO, los tiempos de exposición evaluados no influyeron en la supervivencia de los explantes ( $p > 0.05$ ). De igual forma, cuando el tiempo de exposición es 5 minutos, las concentraciones de NaClO evaluadas no afectaron a la viabilidad durante el establecimiento de los segmentos nodales. Sin embargo, a un tiempo de 10 minutos, la tasa de supervivencia es significativamente dependiente de la concentración

de NaClO ( $p < 0.001$ ). Además, se constató la leve influencia que tiene el tiempo de inmersión a un nivel de 2% v/v de NaClO ( $p < 0.1$ ).

**Figura 7**

*Porcentaje de explantes viables y no viables para cada concentración de NaClO y tiempos de inmersión, evaluado a las 4 semanas.*



En conjunto, al analizar la correlación entre las variables de respuesta evaluadas durante la etapa de establecimiento (Tabla 9), se constató que el porcentaje de contaminación tiene una fuerte relación decreciente monótona ( $\rho = -0.99$ ) con la supervivencia del explante, mientras que el grado de asociación entre el porcentaje de necrosis y viabilidad es monótono creciente ( $\rho = 0.51$ ), aunque la confiabilidad de esta correlación es baja ( $p > 0.05$ ).

**Tabla 9**

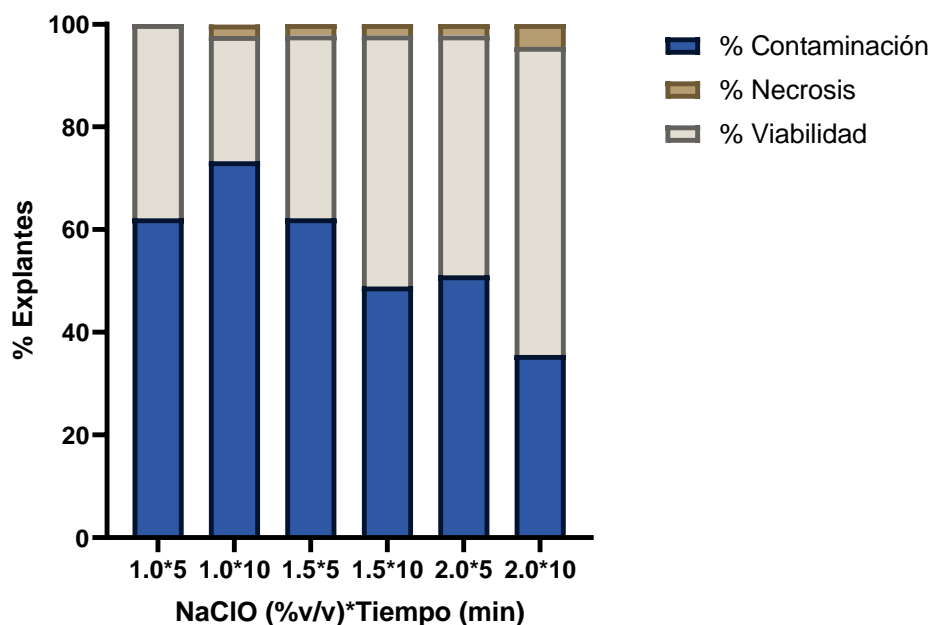
*Correlación del porcentaje de contaminación y necrosis con la viabilidad de segmentos nodales de rosa en la fase de establecimiento.*

Variable 1	Variable 2	n	Spearman	p-valor
% Viabilidad	% Necrosis	6	0.51	0.3046
% Viabilidad	% Contaminación	6	-0.99	0.0003

Al graficar las tres variables se puede observar que el porcentaje de contaminación tiene mayor influencia sobre la tasa de supervivencia, en contraste con la necrosis de los explantes que es mínima para todos los tratamientos (Figura 8).

### Figura 8

Porcentaje de contaminación, necrosis y viabilidad para cada concentración de NaClO y tiempos de inmersión, evaluado a las 4 semanas.



### Etapa II: Multiplicación

En esta fase se evaluó el efecto de la concentración de ANA (0, 0.01, 0.05 y 0.1 mg/L) en el índice de multiplicación y longitud del brote en diferentes cultivares de rosa (*Rosa hybrida* cvs.) evaluado a las 9 y 14 semanas de cultivo, es decir durante dos subcultivos consecutivos.

#### Índice de multiplicación

La Tabla 10 resume las observaciones obtenidas para la tasa de proliferación para cada uno de los tratamientos probados. Se puede observar que el máximo (2.24) y mínimo (1.44) índice de proliferación se presentaron en el primer subcultivo a concentraciones de 0 y 0.01 mg/L de ANA respectivamente. El resto de tratamientos,

tienen valores inferiores a dos brotes por explante a las 9 semanas de cultivo. En lo correspondiente al efecto del subcultivo, el comportamiento creciente o decreciente del índice de multiplicación varió según la concentración de ANA evaluada, sin establecer un patrón simple. Al graficar los datos, se notó que los valores de la DE entre tratamientos y subcultivos se solapan, lo cual refleja un alto coeficiente de variación entre las medidas experimentales para el índice de multiplicación (Figura 9).

**Tabla 10**

*Número de brotes por explante de rosa en la fase de multiplicación a diferentes concentraciones de ANA y subcultivos.*

ANA (mg/L)	Subcultivo	
	1	2
0.00	2.24 ± 0.8 <sup>(1)</sup>	1.91 ± 1.2
0.01	1.44 ± 0.6	1.55 ± 0.7
0.05	1.91 ± 1.2*	1.82 ± 0.9*
0.10	1.86 ± 0.5*	2.03 ± 1.1*

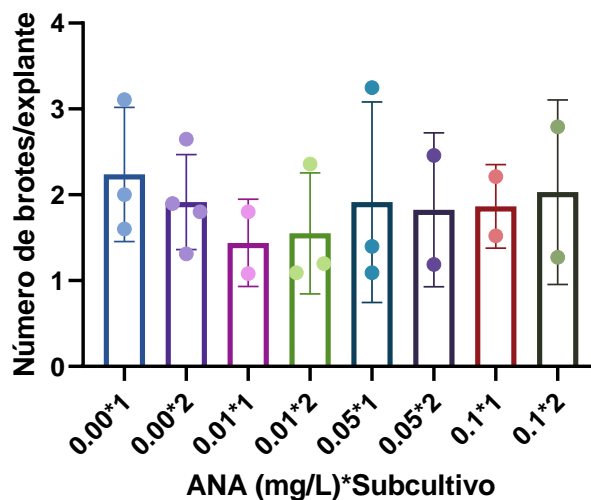
*Nota.* <sup>(1)</sup> Cada valor es la media ± DE con un tamaño muestral n = 15 para cada tratamiento, por triplicado. \*Callo en el extremo inferior del brote.

El análisis inferencial (test de Kruskal Wallis) comprobó que en efecto no existen diferencias significativas asociadas a la concentración de ANA, subcultivo o su interacción ( $p > 0.05$ ). Esto último es concordante con lo observado en la Figura 10 donde no se puede distinguir un patrón de cambio entre tratamientos, aunque en apariencia una concentración de 0.1 mg/L generó brotes más vigorosos respecto al resto de tratamientos.

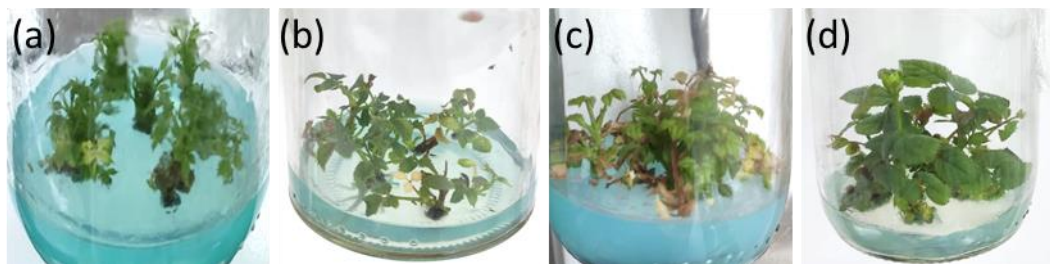


**Figura 9**

*Número de brotes por explante de rosa en la fase de multiplicación de a diferentes concentraciones de ANA y subcultivos.*

**Figura 10**

*Brotes de rosa en la fase de multiplicación después de ocho semanas de cultivo a diferentes concentraciones de ANA: (a) 0, (b) 0.01, (c) 0.05 y (d) 0.1 mg/L.*



### **Longitud del brote**

En lo que respecta a la longitud del brote, independientemente del subcultivo se observó que esta variable de respuesta aumenta conforme se incrementa la concentración de ANA en el medio de cultivo (Tabla 11). De esta manera, la mayor longitud promedio del brote se obtuvo para una concentración de 0.1 mg/L ANA (subcultivo 1: 17.6 mm, subcultivo 2: 16.3 mm) (Figura 11c), mientras que en ausencia de esta auxina los explantes tuvieron la menor longitud (subcultivo 1: 11.7 mm,

subcultivo 2: 8.9 mm) (Figura 11a). Además, se observó una reducción de la longitud de los brotes entre el primer y segundo subcultivo (Figura 11a y b) para la mayoría de concentraciones de ANA con excepción del tercer tratamiento (0.05 mg/L de ANA).

**Tabla 11**

*Longitud promedio (mm) de los brotes de rosa en la fase de multiplicación a diferentes concentraciones de ANA y subcultivos.*

ANA (mg/L)	Subcultivo <sup>(1)</sup>	
	1	2
0.00	A 11.7 a <sup>(2)</sup>	A 8.9 b
0.01	BC 15.9 a	B 10.8 b
0.05	B 15.4 a	C 16.2 a
0.10	C 17.6 a	C 16.3 a

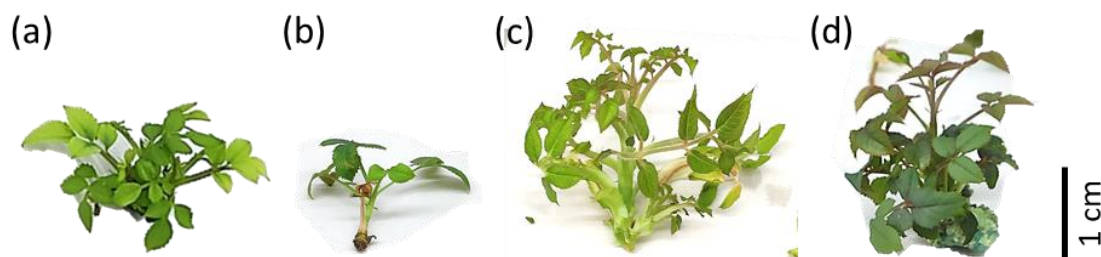
*Nota.* <sup>(1)</sup> Cada valor es la media con un tamaño muestral n = 15 para cada tratamiento, por triplicado.

<sup>(2)</sup> Las medias seguidas de la misma letra mayúscula (A, B, C) en la columna o de la misma letra minúscula (a, b) en la fila no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ( $p = 0.05$ ).

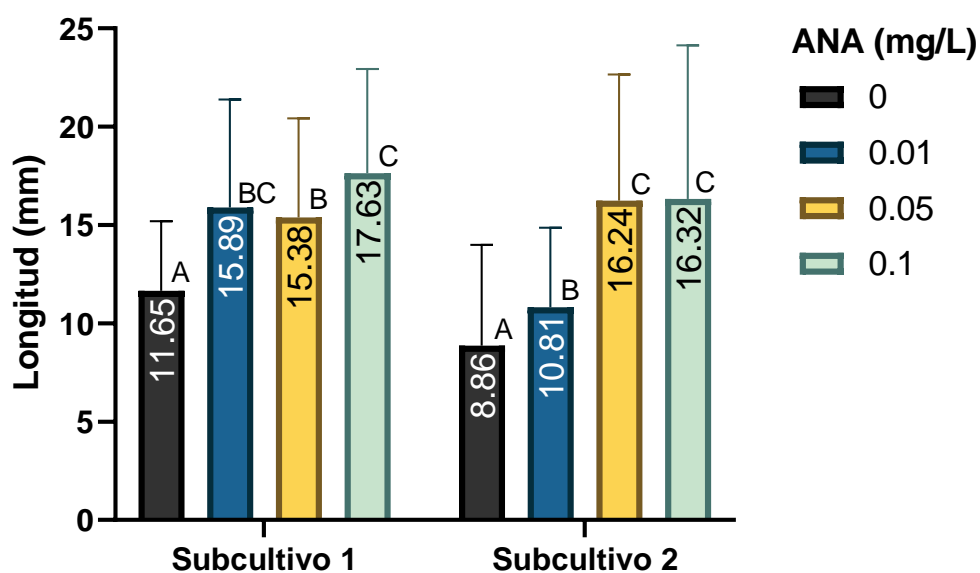
La prueba ANOVA demostró que la concentración de ANA, el subcultivo y su interacción son fuentes de variación significativas en la longitud ( $p < 0.001$ ). Al proceder con la comparación de medias se constató que una concentración de 0.1 mg/L ANA resultó en una mayor elongación de los explantes durante el primer subcultivo, aunque comparte el mismo grupo de diferencias con los brotes sometidos a 0.05 mg/L ANA al finalizar el segundo periodo de multiplicación (Figura 12). Por otro lado, el efecto del subcultivo es notorio a 0 y 0.01 mg/L de ANA con una reducción de la longitud media (Figura 12), en contraste con los tratamientos con 0.05 y 0.1 mg/L de ANA, donde la variación no es significativa (Figura 11c y d).

**Figura 11**

*Brotos de rosa en la fase de multiplicación a diferentes concentraciones de ANA: (a y b) 0 mg/L, (c y d) 0.1 mg/L; y etapas de cultivo (a y c) primer subcultivo, (b y d) segundo subcultivo.*

**Figura 12**

*Longitud promedio (mm) de los brotes de rosa en la fase de multiplicación a diferentes concentraciones de ANA y subcultivos.*



*Nota.* <sup>(1)</sup> Cada barra corresponde al valor de la media con un tamaño muestral  $n = 15$  para cada tratamiento, por triplicado.

<sup>(2)</sup> Las barras con la misma letra mayúscula (A, B, C) no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ( $p = 0.05$ ).

### Etapa III: Enraizamiento *in vitro*

En esta etapa se evaluó el efecto sinérgico entre un nivel fijo de ANA (0.1 mg/L) y tres concentraciones de IBA (0, 0.25, 0.5 mg/L) en el porcentaje de enraizamiento, supervivencia y número de raíces por brote de *Rosa hybrida*. Dado que el porcentaje de enraizamiento y supervivencia son variables dicotómicas, se analizó por separado el efecto de ambas respuestas.

#### Porcentaje de enraizamiento

Durante esta fase, el medio que contenía únicamente 0.1 mg/L ANA presentó el menor porcentaje de enraizamiento (44.68%), mientras que su combinación con IBA aumentó sensiblemente la eficacia del enraizamiento a un 61.9% con 0.25 mg/L IBA y un máximo de 88.89% a una concentración de 0.5 mg/L IBA (Tabla 12).

**Tabla 12**

*Efecto de las auxinas en el porcentaje de enraizamiento de brotes de rosa, evaluado a las 4 semanas de cultivo.*

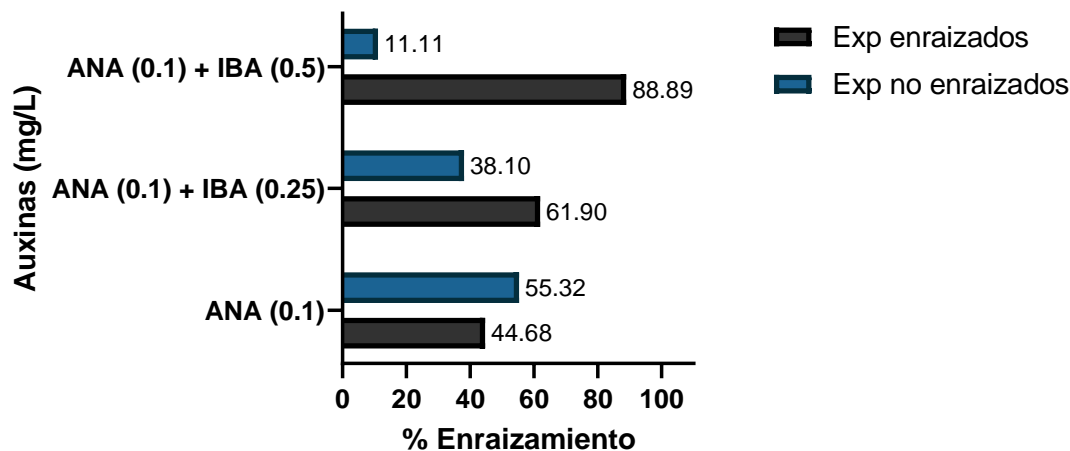
Auxinas (mg/L)	% Enraizamiento
ANA (0.1) + IBA (0.0)	44.68
ANA (0.1) + IBA (0.25)	61.90
ANA (0.1) + IBA (0.5)	88.89
Influencia de auxinas ( $\chi^2$ )	****

*Nota.* El tamaño muestral para cada tratamiento  $n = 45$ , \*\*\*\* significativo al 0.1%.

Resultado del test chi-cuadrado se comprobó la contundente dependencia entre el porcentaje de enraizamiento y los tratamientos aplicados ( $p < 0.0001$ ), lo cual confirma que existió un efecto sinérgico entre las auxinas (ANA e IBA) y las concentraciones probadas. Además, se observa una tendencia evidente que al aumentar la concentración de IBA en el medio, el porcentaje de explantes enraizados se incrementa (Figura 13).

**Figura 13**

Porcentaje de explantes enraizados y no enraizados de rosa para cada combinación probada de auxinas, evaluado a las 4 semanas.

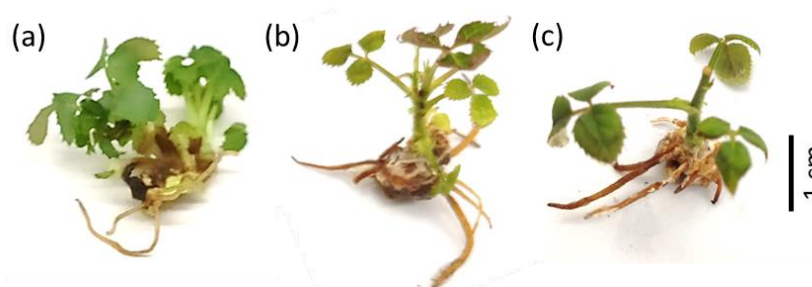


#### Número de raíces por brote

La Tabla 13 refleja que el número promedio de raíces por explante aumenta conforme la concentración de IBA se incrementa. Así, el menor valor corresponde al tratamiento con una única auxina (0.1 mg/L ANA) con 1.81 raíces/brote; asciende a 2.19 para la combinación de ANA y 0.25 mg/L IBA, hasta el máximo de 4.78 raíces/plántula cuando la concentración de IBA es 0.5 mg/L. Todos los tratamientos generaron callos en la base de los brotes y presentaron un ligero pardeamiento de las raíces (Figura 14).

**Figura 14**

Brotos de rosa en la fase de enraizamiento a las cuatro semanas de cultivo para cada combinación probada de auxinas (mg/L): (a) ANA (0.1), (b) ANA (0.1) + IBA (0.25) y (c) ANA (0.1) + IBA (0.5).



**Tabla 13**

*Efecto de las auxinas en el número de raíces por brote de rosa, evaluado a las 4 semanas de cultivo.*

<b>Auxinas (mg/L)</b>	<b>Número de raíces por explante</b>
<b>ANA (0.1) + IBA (0.0)</b>	1.81 ± 0.50 a
<b>ANA (0.1) + IBA (0.25)</b>	2.19 ± 1.22 b
<b>ANA (0.1) + IBA (0.5)</b>	4.78 ± 0.73 c

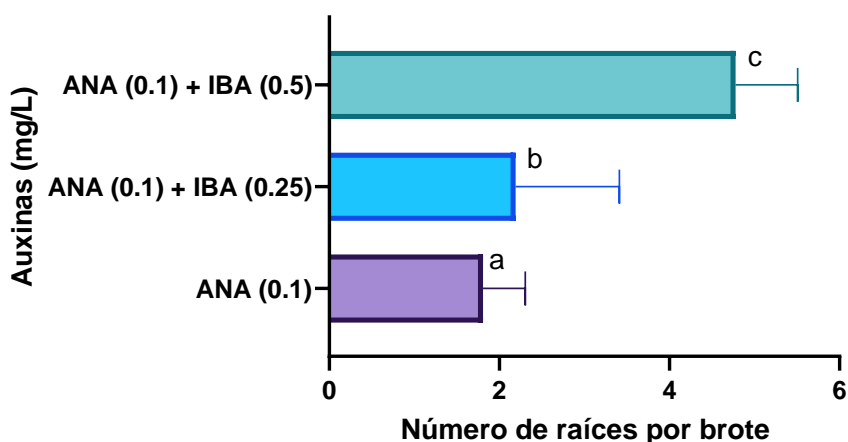
*Nota.* <sup>(1)</sup> Cada valor es la media ± DE con un tamaño muestral n = 15 para cada tratamiento, por triplicado.

<sup>(2)</sup> Las medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey (p = 0.05).

El test ANOVA demostró que los tratamientos tuvieron una influencia significativa en el número promedio de raíces por explante. Al proceder con la comparación de medias se constató que cada tratamiento pertenece a un grupo de diferencias individual, siendo la combinación de 0.1 mg/L ANA y 0.5 mg/L IBA el tratamiento que presenta la mejor respuesta rizogénica (Figura 15).

**Figura 15**

*Número promedio de raíces/explante de rosa para cada combinación probada de auxinas, evaluado a las 4 semanas de cultivo.*



### **Tasa de supervivencia**

Con respecto a la supervivencia de los brotes a la etapa de enraizamiento, cuando ANA (0.1 mg/L) fue la única auxina en el medio de cultivo, solo el 57.45% de los explantes se mantuvieron viables luego de cuatro semanas, le sigue la combinación de 0.1 mg/L ANA y 0.25 mg/L IBA con un 73.81% y, la mayor tasa de supervivencia se alcanzó con 0.1 mg/L ANA y 0.5 mg/L IBA con 88.83% de las plántulas supervivientes (Tabla 14). Los brotes muertos presentaban la totalidad de sus hojas senescentes y signos necróticos en el tallo.

**Tabla 14**

*Efecto de las auxinas en el porcentaje de supervivencia de brotes de rosa, evaluado a las 4 semanas de cultivo.*

<b>Auxinas (mg/L)</b>	<b>% Supervivencia</b>
<b>ANA (0.1) + IBA (0.0)</b>	57.45
<b>ANA (0.1) + IBA (0.25)</b>	73.81
<b>ANA (0.1) + IBA (0.5)</b>	88.89
<b>Influencia de auxinas (<math>\chi^2</math>)</b>	**

*Nota.* El tamaño muestral para cada tratamiento  $n = 45$ , \*\* significativo al 5 %.

Al comparar las frecuencias de supervivencia, el test chi-cuadrado develó que esta variable es dependiente de las concentraciones de auxinas evaluadas ( $p < 0.05$ ). Al observar la Figura 16 es notorio que la tasa de supervivencia se incrementa cuando la concentración de IBA aumenta en el medio en combinación con el nivel fijo de ANA.

En conjunto, al analizar la correlación entre las variables de respuesta evaluadas durante la etapa de enraizamiento (Tabla 15), se constató que tanto el porcentaje de enraizamiento como el número de raíces por explante tienen una fuerte relación creciente monótona ( $p = 1.00$ ) con la supervivencia del brote. Sin embargo, la

confiabilidad de ambas correlaciones es baja ( $p > 0.05$ ), aunque gráficamente la tendencia creciente es notoria (Figura 16).

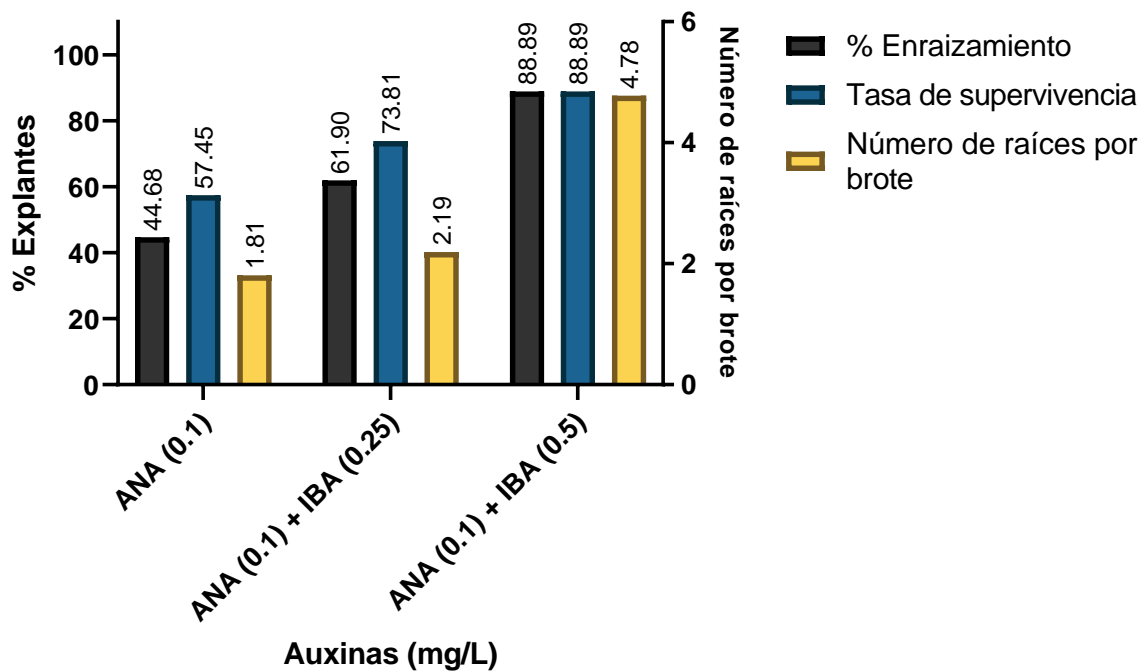
**Tabla 15**

*Correlación del porcentaje de enraizamiento y número de raíces por explante con la supervivencia de los brotes en la fase de enraizamiento.*

Variable 1	Variable 2	n	Spearman	p-valor
% Supervivencia	% Enraizamiento	3	1.00	0.1573
% Supervivencia	Número raíces por explante	3	1.00	0.1573

**Figura 16**

*Porcentaje de enraizamiento, número de raíces por explante y tasa de supervivencia de los brotes de rosa para cada combinación probada de auxinas, después de 4 semanas de cultivo.*





## Capítulo V: Discusión

En el presente estudio se desarrolló un protocolo de cultivo *in vitro* de rosas de corte (*Rosa hybrida* L.), para lo cual se ejecutó ensayos donde se evaluó la eficacia de la desinfección de segmentos nodales para el establecimiento y el efecto de la concentración de una auxina o su combinación en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de brotes, respectivamente.

### Etapa I: Establecimiento *in vitro*

#### Contaminación

La contaminación microbiana es uno de los principales problemas en el cultivo de tejidos vegetales, generando pérdidas económicas y de material vegetal considerables. El NaClO es un desinfectante extensamente utilizado para la esterilización superficial de explantes, ya que tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana y es capaz de matar rápidamente esporas vegetativas, bacterias, hongos, protozoos y virus (Dychdala, 2001). Sin embargo el tiempo y la concentración de esta sustancia deben optimizarse según la especie y el tipo de tejido (Pierik, 1990).

En los ensayos ejecutados se observó que los tratamientos que emplearon NaClO con concentraciones de 1.0 y 1.5% (v/v) presentaron los mayores porcentajes de contaminación (superiores al 45%). Esto coincide con las observaciones de Salehi (1995), que presentó una alta tasa de contaminación al emplear soluciones al 1% de NaClO en la desinfección de segmentos nodales de rosa miniatura. Por otro lado, el análisis estadístico demostró que con un tiempo de exposición de cinco minutos la contaminación de los explantes es independiente de las concentraciones de NaClO, es decir que resulta insuficiente para la esterilización superficial (Tabla 6). Ozel & Arslan (2006) llegaron a la misma conclusión empleando soluciones puras de blanqueador comercial (5 – 6 % v/v NaClO) para la desinfección de brotes de rosa “Heritage” durante cinco minutos de aplicación.

Una revisión a la literatura, permite identificar otros procedimientos para desinfectar explantes de rosa que implican aplicar dicloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) al 0.1% p/v durante 10 a 30 minutos seguido de enjuagues con agua destilada estéril (Rahman *et al.*, 1992; Rout *et al.*, 1989; Senapati & Rout, 2008). Sin embargo, el  $\text{HgCl}_2$  es muy tóxico y difícil de remover del explante (Roca & Mroginski, 1991). Otras investigaciones emplean concentraciones de NaClO y/o tiempos de exposición mayores a los ensayados durante el proyecto (Bayanati *et al.*, 2015; Borja & Rivas, 2017; Davies, 1980), inclusive utilizan soluciones de antibióticos (gentamicina, ampicilina, tetraciclina o amoxicilina) para el control de contaminantes endófitos (Salehi & Khosh-Khui, 1997). Aunque en el presente trabajo se obtuvo un porcentaje de contaminación de 35.6% para el mejor tratamiento (NaClO 2% v/v y 10 min) las alternativas antes mencionadas podrían resultar en una proporción menor de explantes contaminados, y por tanto acordes a las necesidades de la micropropagación comercial.

### **Necrosis**

El establecimiento *in vitro* de ciertas especies vegetales, en particular especies leñosas, está restringido por el pardeamiento letal en los tejidos vegetales y el medio de cultivo (Azofeifa, 2008). Este problema, está asociado al estrés oxidativo que sufren las plántulas a nivel celular, por radicales libres y la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa, provocando daño e incluso la muerte del explante (necrosis) (Amiot, 1996).

Los radicales libres son generados o liberados durante el proceso de desinfección, corte y cultivo del explante (George, 1996). En concordancia, el efecto fitotóxico debido a altas concentraciones de NaClO y la exposición prolongada a este desinfectante han sido asociados a mayores tasas de necrosis en el establecimiento *in vitro* (Pierik, 1990). Sin embargo, en la presente investigación las concentraciones de NaClO (1 – 2 % v/v) y tiempos de exposición (5 y 10 minutos) evaluados no generaron

un necrosamiento significativo de los segmentos nodales de *Rosa hybrida* durante su establecimiento (Tabla 6) con un máximo de 4.4% (Figura 5). En base a ello se puede inferir que los niveles testeados de ambos factores (concentración de NaClO y tiempo de exposición) durante la esterilización superficial no generan una necrosis apreciable para los segmentos nodales.

Por otro lado, una estrategia para sobrellevar la oxidación y necrosis en la iniciación de cultivos *in vitro* de rosa es añadir sustancias antioxidantes al medio de cultivo como: polivinilpirrolidona, ácido cítrico o ácido ascórbico (Pati *et al.*, 2006). Así, en las etapas de establecimiento y multiplicación se agregó ácido cítrico (0.1 g/L) al medio de cultivo, lo cual influyó notablemente en la reducción en la necrosis de los explantes respecto a un ensayo preliminar (datos no mostrados).

### **Viabilidad**

Existen varios factores que pueden afectar la viabilidad y capacidad de regeneración de un explante, como el material vegetal (genotipo, edad, condiciones de la planta madre, tamaño del explante, entre otros), el proceso de desinfección, medio y condiciones de cultivo (George *et al.*, 2008; Pierik, 1990). En este trabajo se analizó la influencia del protocolo de esterilización superficial, que debe garantizar la viabilidad del explante, y está afectado por la concentración, el período de aplicación y la temperatura de los desinfectantes (Yildiz, 2012).

Como se mencionó anteriormente, en los ensayos ejecutados se halló que la eficiencia en la remoción de contaminantes fue determinante para la supervivencia de los explantes (Tabla 9). En concordancia, se estableció que la combinación de 2% de NaClO por 10 minutos de exposición resultó en la mayor tasa de supervivencia durante el establecimiento (Tabla 8). De forma similar, Villa & Arbeláez (2019) reportan una viabilidad del 62% en el establecimiento de *Rosa sp.* empleando soluciones de NaClO por 10 minutos.

Por otro lado, se conoce que las plantas cultivadas en invernadero tienen menor densidad de microorganismos superficiales con respecto a las que crecen en campo (Pierik, 1990). El mismo efecto se ha comprobado con respecto a la edad del explante, asociando a órganos jóvenes un menor porcentaje de contaminación (Ndakidemi *et al.*, 2013). Considerando que el material vegetal de la presente investigación provino de invernadero y la edad de las plantas no excedió los 2 años de cultivo, son factores que pudieron reducir el porcentaje de contaminación y, en consecuencia, elevar el porcentaje de viabilidad.

## **Etapa II: Multiplicación**

### ***Índice de multiplicación***

Con frecuencia el desarrollo de múltiples brotes requiere de un equilibrio entre citoquininas, en combinación con bajas concentraciones de una auxina (Roca & Mroginski, 1991). Con respecto a la citoquinina, varios autores han concluido que BA (2.0–3.0 mg/l) es el regulador de crecimiento más eficaz para estimular la proliferación de brotes en *Rosa hybrida* L (Carelli & Echeverrigaray, 2002; Davies, 1980; Salehi, 1995). Además, Vijaya & Satyanarayana (1991) investigaron el uso de tres auxinas en combinación con BA (2.0 mg/l) y encontraron que ANA era más eficaz que AIA o IBA en la producción de múltiples brotes.

En el presente trabajo, se encontró que no existen diferencias significativas en la tasa de multiplicación para las concentraciones de ANA evaluadas, siendo el tratamiento control (ausencia de ANA) el cuál reportó un índice de multiplicación ligeramente mayor que el resto de tratamientos (Tabla 10). En su estudio Kim *et al.* (2003) reportan que la adición de ANA durante la fase de multiplicación disminuyó el índice de proliferación en cinco de seis cultivares de *Rosa hybrida*.

Varios estudios señalan que concentraciones altas de auxina en el medio inhiben la multiplicación de los explantes, debido a que auxinas como ANA conservan la

dominancia apical, dado que su transporte es dependiente de energía moviéndose desde el ápice hasta la base de la planta (Taiz & Zeiger, 2010). Este flujo interrumpe la formación de yemas axilares del tallo e impulsa la elongación (Pierik, 1990). En base a investigaciones que concluyen que combinaciones de BA con ANA a concentraciones entre 0.003 – 0.004 mg/L (Davies, 1980; Nak-Udom *et al.*, 2010) generaron las mayores tasas de proliferación de brotes de rosa, es probable que el nivel más bajo de ANA testeado (0.01 mg/L) haya resultado deletéreo para las variedades estudiadas.

Por otro lado, la formación de callos en la base de los explantes es un efecto común observado en la micropropagación de rosa asociado generalmente a altas concentraciones de una auxina (ANA, para esta investigación) o varias auxinas combinadas (Rout *et al.*, 1989, 1990; Senapati & Rout, 2008).

Con respecto al efecto del subcultivo sobre el índice de multiplicación, Salehi (1995) menciona que es dependiente del cultivar, manteniéndose estadísticamente similar durante el primer y segundo subcultivo para el cultivar de minirosa 'Baby Masquerade'. Estos resultados son coherentes con el análisis inferencial, que descartó el efecto del subcultivo como factor de variación de la tasa de proliferación en el presente proyecto.

### ***Longitud del brote***

Una de las funciones de las auxinas en la planta es promover la elongación celular (Roca & Mroginski, 1991). Los resultados de los ensayos son coherentes con esta afirmación pues conforme la concentración de ANA aumentó en el medio de cultivo, la media de la longitud de los brotes se incrementó sensiblemente con máximos entre 16.3 a 17.6 mm a niveles de 0.1 mg/L de ANA.

Carelli & Echeverrigaray (2002) obtuvieron una longitud promedio de  $12.4 \pm 0.7$  mm en brotes de rosa cv. Baronesse en medio MS suplementado con 3.0 mg/L BA y 0.5 mg/L ANA. Por otro lado, una mayor longitud de brotes está asociada generalmente a

una mejor calidad y desarrollo *in vitro*, respecto a los explantes pequeños sensibles al estrés y la necrosis (Pierik, 1990).

### **Etapa III: Enraizamiento *in vitro***

#### ***Porcentaje de enraizamiento***

La capacidad de enraizamiento *in vitro* depende de una interacción compleja de factores internos (genotipo, edad, estrés fisiológico) y externos (luz, temperatura, pH, entre otros), aunque en la práctica generalmente se controla por niveles hormonales en el medio de cultivo (Rahman *et al.*, 1992). En este trabajo se halló que la combinación de las auxinas ANA e IBA, tienen un efecto sinérgico sobre el porcentaje de enraizamiento de brotes de rosa. En específico, a un nivel fijo de 0.1 mg/L ANA solo el 44.68 % de explantes desarrollaron raíces, y aumentó hasta un 88.9% cuando se combinó con 0.5 mg/L IBA (Tabla 12). De hecho, varios autores han concluido que la combinación de dos tipos de auxinas puede mejorar la formación de raíces en la rosa (Rout *et al.*, 1989; Salehi, 1995; Singh & Syamal, 1999). Khosh-Khui & Sink (1982b) encontraron que la mejor combinación para la producción de plántulas enraizadas era 0.1 mg/L ANA con 0.05 mg/L de AIA o IBA. Además, señalaron que la incorporación de dos auxinas fue más efectiva para la formación de raíces que su efecto por separado. Singh & Syamal (2001) obtuvieron entre 38 – 41 % de brotes enraizados para dos cultivares de *Rosa hybrida* cuando ANA (0.2 mg/L) era la única fitohormona en el medio de cultivo, y mejoró al agregar IBA (0.5 – 1.0 mg/L) a la composición del medio.

Por otra parte, aunque no se evaluó en este estudio, se ha reportado que la reducción de la concentración de sales de MS incrementa el enraizamiento en rosa (Khosh-Khui & Sink, 1982a; Kim *et al.*, 2003; Skirvin & Chu, 1979). Por este motivo, en los ensayos se empleó medio a la mitad de concentración de sales de MS.

Adicionalmente, la reducción de la luminosidad durante esta etapa, lo cual se consiguió manteniendo la tapa del frasco de cultivo durante la incubación de los explantes,

probablemente influyó positivamente en la tasa de formación de raíces (Khosh-Khui & Sink, 1982b).

### ***Número de raíces por brote***

Se ha encontrado que los brotes *in vitro* de rosa que desarrollan un sistema radicular con mayor número de raíces continúan creciendo vigorosamente durante la aclimatación, facilitando la adaptación de las plantas al medio *ex vitro* (Schneider, 2005). En este contexto, en la investigación ejecutada se observó que el número promedio de raíces por plántula aumentó al integrar dos auxinas en el medio de cultivo, alcanzando un máximo de 4.78 raíces por plántula con la combinación 0.1 mg/L ANA y 0.5 mg/L IBA (Tabla 13). Estos resultados coinciden con el trabajo de Singh & Syamal (2001), que reportaron el mayor número de raíces por brote en dos cultivares de *Rosa hybrida* cuando se combinó ANA (0.2 mg/L) e IBA (0.5 – 1.0 mg/L).

Por otro lado, Bressan *et al.* (1982) encontraron que la rizogénesis de la rosa se vio afectada por las condiciones de cultivo durante la multiplicación de los brotes. Específicamente, el número de raíces por explante disminuyó al aumentar la concentración de BA en la fase de multiplicación. Atribuyeron este efecto al BA acumulado en el tejido, ya que el inicio de la raíz puede inhibirse si el nivel de citoquininas endógenas es demasiado alto. Dado que en el presente trabajo la concentración BA (2 mg/L) fue igual en todos los ensayos de multiplicación, es probable que este fenómeno haya influido por igual en el número de raíces por explante en todos los tratamientos evaluados.

### ***Tasa de supervivencia***

El etileno es un compuesto que regula muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, entre ellos es un fuerte promotor de la senescencia y abscisión foliar (Taiz & Zeiger, 2010). Su síntesis se inicia por una amplia gama de estímulos como heridas, anaerobiosis, maduración o exposición a auxinas. Con

respecto a esto último, se conoce que el tratamiento con auxinas aumenta la biosíntesis de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa, aumentando así la producción de etileno a partir de S-adenosilmetionina (Yang & Hoffman, 1984). Esto sugiere que algunas de las respuestas de las plantas a las auxinas son causadas en última instancia por el etileno producido en respuesta a su estímulo (George *et al.*, 2008). Por lo tanto, la senescencia foliar y posterior mortalidad observada en este estudio puede explicarse en parte por el efecto de las auxinas sobre la síntesis de etileno en las plántulas de rosa.

Otro factor que debe considerarse es el periodo de la fase de enraizamiento. Rout *et al.* (1990) y Salehi (1995) observaron que el mantenimiento de brotes de rosa en medio para inducción de raíces, es decir en ausencia de citoquininas, más allá 10 – 14 días resultó en un rápido deterioro de los cultivos y una reducción dramática en la supervivencia de las plántulas trasplantadas. Concluyeron entonces que la presencia de auxina es necesaria solo para la inducción de la rizogénesis, que ocurren en los primeros días después de transferir las plantas al medio de enraizamiento, pero no para el subsecuente desarrollo de la raíz en rosas. En el presente trabajo la etapa de enraizamiento duró cuatro semanas, por lo tanto, aunque el periodo de cultivo pudo influir en la mortalidad de los explantes, la evidencia señala que la combinación de ANA e IBA permite alcanzar porcentajes de cercanos al 90% (Tabla 14).

Cabe señalar que el periodo de cuatro semanas se eligió en base a los hallazgos de Schneider (2005), quien menciona que una duración mínima de la fase de enraizamiento de cinco semanas en la micropropagación de los cultivares 'Kardinal' y 'Lambada' reduce significativamente la tasa de mortalidad durante la aclimatación y que las plantas de rosas no se vieron afectadas negativamente por un contacto prolongado con la auxina en el medio de enraizamiento.

Con respecto a la correlación hallada entre la tasa de supervivencia, el porcentaje de enraizamiento y el número de raíces por brote (Tabla 15), según Pierik



(1990) una adecuada respuesta rizogénica que no induzca únicamente una callogénesis en la base del explante y forme varias raíces mejora la viabilidad y calidad de las plántulas tanto *in vitro*, como su adaptación posterior a las condiciones *ex vitro*, en ciertas especies.

Finalmente, aunque en la literatura se pueden encontrar varios estudios que describen protocolos para la micropropagación de variedades específicas de rosa (Attia et al., 2012; Bayanati et al., 2015; Nak-Udom et al., 2010; Singh & Syamal, 1999; Tawfik et al., 2018), son escasas las investigaciones cuyo objetivo fue establecer un procedimiento base para la propagación *in vitro* de varios cultivares (Davies, 1980; Kim et al., 2003; Senapati & Rout, 2008). Por otro lado, los cambios constantes en las preferencias del mercado de flores han derivado en una alta tasa de rotación de las variedades en cultivo por parte de los productores de rosa en Ecuador, una necesidad que la propagación convencional vegetativa no cubre (Paredes, 2019). En ese contexto, la presente investigación adquiere relevancia al describir un método base para la propagación *in vitro* de rosas de corte (*Rosa hybrida* L.) que permite una rápida multiplicación de nuevas variedades libres de enfermedades, en un período de tiempo relativamente corto y menor espacio físico.

## Capítulo VI: Conclusiones

- Se estandarizó un protocolo de desinfección para el establecimiento de segmentos nodales de *Rosa hybrida* L. mediante el cual se obtuvo un 62.2 % de explantes viables a través de la combinación de una solución de hipoclorito de sodio al 2% v/v y 10 minutos de aplicación.
- Se determinó que el ácido 1-naftalenacético (ANA) a las concentraciones evaluadas, no presentó un efecto significativo respecto al índice de multiplicación de brotes de *Rosa hybrida* L. independientemente del subcultivo, siendo el tratamiento control (ausencia de ANA) el cuál alcanzó un índice de multiplicación ligeramente mayor, con un promedio de 2.24 brotes por explante.
- Se encontró que una concentración creciente de ANA tiene un efecto positivo en la elongación de brotes de rosa durante la fase de multiplicación, alcanzando una longitud promedio mayor a los 16 mm durante dos subcultivos consecutivos en medio con 0.1 mg/L de ANA.
- Se estableció que la combinación de ANA y ácido 3-indol butírico (IBA) en un medio con la mitad de la concentración de sales de MS, tiene un efecto sinérgico que incrementa de manera considerable el porcentaje de enraizamiento, número de raíces por explante y la tasa de supervivencia en comparación con la aplicación individual de ANA durante el enraizamiento *in vitro* de plántulas de *Rosa hybrida* L. En específico para una concentración de 0.1 mg/L de ANA con 0.5 mg/L de IBA, se obtuvo un 88.89% de brotes enraizados con un promedio de 4.78 raíces por plántula y una supervivencia del 88.89%.

## Capítulo VII: Recomendaciones

- Se recomienda ensayar protocolos que utilicen concentraciones de hipoclorito de sodio y/o tiempos de exposición mayores, así como la aplicación de soluciones estériles de antibióticos durante la desinfección de segmentos nodales de rosa para reducir el porcentaje de contaminación.
- Evaluar el efecto de concentraciones de ANA menores a las probadas en este estudio o de otras auxinas con el objetivo de aumentar el índice de multiplicación de brotes de *Rosa hybrida*.
- Determinar la influencia de una etapa de elongación de brotes entre subcultivos y previo al enraizamiento empleando ANA y AG<sub>3</sub>.
- Ejecutar la fase de aclimatación de las plántulas y comparar el efecto del periodo de permanencia en el medio de enraizamiento en el desarrollo y supervivencia en campo de plantas de *Rosa hybrida*.

## Referencias

- Akram, M., Riaz, M., Munir, N., Akhter, N., Zafar, S., Jabeen, F., Ali Shariati, M., Akhtar, N., Riaz, Z., Altaf, S. H., Daniyal, M., Zahid, R., & Said Khan, F. (2020). Chemical constituents, experimental and clinical pharmacology of *Rosa damascena*: A literature review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *72*(2), 161–174.  
<https://doi.org/10.1111/jphp.13185>
- Altman, A., & Loberant, B. (2003). Micropropagation of Plants, Principles and Practices. In *Encyclopedia of Cell Technology*. American Cancer Society.  
<https://doi.org/10.1002/0471250570.spi076>
- Amiot, M. J. (1996). Polyphenols, oxidation and colour: Progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products. *Herba Polonica*, *42*(4), 237–247.
- Anderson, R. (2003). The Andean Trade Preference Act and the Rose Trade between Ecuador and the US. *Economics*.
- Attia, A., Dessoky, E., & El-tarras, A. (2012). *In vitro* propagation of *Rosa hybrida* L. cv. Al-Taif Rose plant. *African Journal of Biotechnology*, *11*(48), 10888–10893.  
<https://doi.org/10.5897/AJB12.781>
- Azofeifa, Á. (2008). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, *20*(1). <https://doi.org/10.15517/am.v20i1.4990>
- Bayanati, M., Davoodi, D., & Jafarkhani Kermani, M. (2015). Effect of Agar and Different Culture Media on the Micropropagation of *Rosa hybrida* cv. 'Black Baccara'. *Journal of Ornamental Plants*, *5*(2), 75–81.
- Bendahmane, M., Dubois, A., Raymond, O., & Bris, M. L. (2013). Genetics and genomics of flower initiation and development in roses. *Journal of Experimental Botany*, *64*(4), 847–857. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers387>
- Borja, M., & Rivas, F. (2017). *Identificación de variables significativas para la multiplicación in vitro de dos variedades de rosa (Rosa x hybrida) con miras a un*

- proceso de floración in vitro* [Tesis de pregrado, Universidad de las Américas].  
<http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/8208/1/UDLA-EC-TIB-2017-46.pdf>
- Bressan, P., Kim, Y., Hyndman, S., Hasegawa, P., & Bressan, R. (1982). Factors affecting *in vitro* propagation of rose. *Journal of the American Society for Horticultural Science. American Society for Horticultural Science*, 107, 979–990.
- Carelli, B. P., & Echeverrigaray, S. (2002). An improved system for the *in vitro* propagation of rose cultivars. *Scientia Horticulturae*, 92(1), 69–74.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00280-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00280-1)
- Castilla, Y. (2005). CULTIVO DE TEJIDOS DE ROSAS (*Rosa* sp): UN ACERCAMIENTO A INVESTIGACIONES RECIENTES. *Cultivos Tropicales*, 26(4), 43–47. Redalyc.
- CFN. (2020). *Ficha Sectorial: Cultivo de Flores* (pp. 1–21). Subgerencia de Análisis de Productos y Servicios, Corporación Financiera Nacional.  
[https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/downloads/biblioteca/2020/ficha-sectorial-3-trimestre-2020/FS\\_Cultivo-de-Flores\\_3T2020.pdf](https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/downloads/biblioteca/2020/ficha-sectorial-3-trimestre-2020/FS_Cultivo-de-Flores_3T2020.pdf)
- Chimonidou, D. (2003). MORPHOLOGY AND ANATOMY | Flower Development and the Abscission Zone. In A. V. Roberts (Ed.), *Encyclopedia of Rose Science* (pp. 504–512). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227620-5/00054-9>
- Cohen, D. (1995). The culture medium. *Acta Horticulturae*, 393, 15–24.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1995.393.2>
- Conefrey, M. (2015, May 10). Roses with altitude: Why Ecuador’s flower industry stands out. *Financial Times*. <https://www.ft.com/content/eb5114d6-d846-11e4-ba53-00144feab7de>
- Costa, J. M., & Van de Pol, P. A. (2003). PROPAGATION | Own-Rooted Cuttings. In A. V. Roberts (Ed.), *Encyclopedia of Rose Science* (pp. 607–615). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B0-12-227620-5/00076-8>

- Cutler, R. R. (2003). SECONDARY METABOLITES | Culinary Uses and Nutritional Value. In A. V. Roberts (Ed.), *Encyclopedia of Rose Science* (pp. 707–716). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227620-5/00200-7>
- Davies, D. R. (1980). Rapid propagation of roses *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 13(4), 385–389. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(80\)90097-7](https://doi.org/10.1016/0304-4238(80)90097-7)
- Debener, Th., & Linde, M. (2009). Exploring Complex Ornamental Genomes: The Rose as a Model Plant. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 28(4), 267–280. <https://doi.org/10.1080/07352680903035481>
- Debergh, P. C. A. (2003). Micropropagation, Hyperhydricity. In *Encyclopedia of Cell Technology*. American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/0471250570.spi077>
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. (2011). *InfoStat* [Programa de cómputo]. Grupo InfoStat, FCA. <http://www.infostat.com.ar/>
- Dubois, L. A. M., Roggemans, J., Soyeurt, G., & De Vries, D. P. (1988). Comparison of the growth and development of dwarf rose cultivars propagated *in vitro* and *in vivo* by softwood cuttings. *Scientia Horticulturae*, 35(3), 293–299. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(88\)90123-9](https://doi.org/10.1016/0304-4238(88)90123-9)
- Dychdala, G. (2001). Disinfection, sterilization, and preservation. *Chlorine and Chlorine Compounds*, 135–137.
- Expoflores. (2021). *Reporte estadístico anual 2020* (pp. 1–11). Expoflores. <https://expoflores.com/wp-content/uploads/2021/03/Anual-Expoflores.pdf>
- Fainstein, R. (1997). *Manual para el cultivo de rosas en Latinoamérica*. Ecuaoffset.
- Fougère-Danezan, M., Joly, S., Bruneau, A., Gao, X.-F., & Zhang, L.-B. (2015). Phylogeny and biogeography of wild roses with specific attention to polyploids. *Annals of Botany*, 115(2), 275–291. PubMed. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu245>

- Fowler, M. R. (2010). Plant Cell Culture, Laboratory Techniques. In *Encyclopedia of Industrial Biotechnology* (pp. 1–22). American Cancer Society.  
<https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib483>
- George, E. F. (1996). *Plant Propagation by Tissue Culture: In Practice (Pt.2)* (2nd ed.). Exegetics Limited.
- George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G.-J. D. (2008). Stock Plant Physiological Factors Affecting Growth and Morphogenesis. In E. F. George, M. A. Hall, & G.-J. D. Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture: The Background* (Vol. 1, pp. 403–422). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_11)
- Gribaudo, I., Restagno, M., & Novello, V. (2003). Vented vessels affect growth rate of *in vitro Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. *Acta Horticulturae*, 616, 129–133.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.616.11>
- Gudin, S. (2003). BREEDING | Overview. In A. V. Roberts (Ed.), *Encyclopedia of Rose Science* (pp. 25–30). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227620-5/00175-0>
- Harden, G. J. (2000). *Flora of New South Wales: Vol. I* (G. J. Harden, Ed.; 2nd ed.). University of New South Wales Press.
- Hartmann, H., Kester, D. E., Davies, F. T., & Geneve, Robert. (2013). *Hartmann & Kester's Plant Propagation: Principles and Practices*. (8th ed.). Pearson Education.
- Hasegawa, P. M. (1979). *In vitro* propagation of rose. *Horticultural Science*, 14(5), 610–612.
- Horn, W. (1992). Micropropagation of rose (*Rosa* L). In Y. Bajaj (Ed.), *High-tech and micropropagation IV* (Vol. 20, pp. 320–342). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- INEC. (2021). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC-2020*. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos.  
<https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web->

inec/Estadisticas\_agropecuarias/espac/espac-  
2020/Presentacion%20ESPAC%202020.pdf

- ITIS. (2011). *Rosa L.* [On-line database]. Integrated Taxonomic Information System.  
[https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=24807#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=24807#null)
- Khosh-Khui, M., & Sink, K. C. (1982a). Micropropagation of New and Old-World Rose Species. *Journal of Horticultural Science*, 57(3), 315–319.  
<https://doi.org/10.1080/00221589.1982.11515058>
- Khosh-Khui, M., & Sink, K. C. (1982b). Rooting-enhancement of *Rosa hybrida* for tissue culture propagation. *Scientia Horticulturae*, 17(4), 371–376.  
[https://doi.org/10.1016/0304-4238\(82\)90118-2](https://doi.org/10.1016/0304-4238(82)90118-2)
- Kim, C., Oh, J., Jee, S., & Chung, J. (2003). *In vitro* Micropropagation of *Rosa hybrid L.* *Journal of Plant Biotechnology*, 5(2), 115–119.
- Leyhe, U., & Horn, W. (1994). Ein Beitrag zur Mikrovermehrung von Rosa-Hybriden / A Contribution to Micropropagation of Rosa-Hybrids. *Die Gartenbauwissenschaft*, 59(2), 85–88. JSTOR.
- Loyola, V., & Ochoa, N. (2018). An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. In V. Loyola & N. Ochoa (Eds.), *Plant Cell Culture Protocols* (pp. 3–13). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_1)
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Jiménez-Moreno, N., Ancín-Azpilicueta, C., & Rodríguez-Yoldi, M. J. (2017). Therapeutic Applications of Rose Hips from Different Rosa Species. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6).  
<https://doi.org/10.3390/ijms18061137>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>



- Nagar, P. K., Sharma, M., Pati, P., & Ahuja, P. (2007). Rose: Some Important Findings with Special Reference to Physiology of Flowering. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 1(2), 102–114.
- Nak-Udom, N., Kantamaht, K., & Kanchanapoom, K. (2010). Micropropagation from cultured nodal explants of rose (*Rosa hybrida* L. cv. 'Perfume Delight'). *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 31(6), 583–586.
- Navarrete, D. P. (2018). *Cut-roses global value chain governance: Ecuadorian exports to The Netherlands. Governance and Development Policy (GDP)* [Master thesis, International Institute of Social Studies]. <http://hdl.handle.net/2105/46585>
- Ndakidemi, C., Mneney, E., & Ndakidemi, P. (2013). Development of Sanitation Protocol for Leaf Explants of *B. huillensis* for *in Vitro* Culture. *American Journal of Plant Sciences*, 4(12), 2425–2430. <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.412301>
- Ozel, C., & Arslan, O. (2006). Efficient Micropropagation of English Shrub Rose “Heritage” Under *in Vitro* Conditions. *International Journal of Agriculture and Biology*, 8(5), 626–629.
- Paredes, M. X. (2019). *Posicionamiento de los floricultores ecuatorianos, frente a los cambios y tendencias del mercado ruso, americano, europeo y chino en la exportación de rosas de corte, como fuente para la toma de decisiones* [Tesis maestra, Universidad Internacional del Ecuador]. <https://repositorio.uide.edu.ec/bitstream/37000/3834/1/T-UIDE-2210.pdf>
- Pati, P. K., Kaur, N., Sharma, M., & Ahuja, P. S. (2010). *In Vitro* Propagation of Rose. In S. M. Jain & S. J. Ochatt (Eds.), *Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants* (pp. 163–176). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-114-1\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-114-1_16)

- Pati, P. K., Rath, S. P., Sharma, M., Sood, A., & Ahuja, P. S. (2006). *In vitro* propagation of rose—A review. *Biotechnology Advances*, 24(1), 94–114.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.07.001>
- Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Mundi Prensa Libros.
- Rahman, S. M., Hossain, M., Rafiul Islam, A. K. M., & Joarder, O. I. (1992). Effects of media composition and culture conditions on *in vitro* rooting of rose. *Scientia Horticulturae*, 52(1), 163–169. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(92\)90018-8](https://doi.org/10.1016/0304-4238(92)90018-8)
- Razdan, M. K. (2003). *Introduction to Plant Tissue Culture*. Science Publishers.
- Roberts, A. V., & Schum, A. (2003). CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE | Micropropagation. In A. V. Roberts (Ed.), *Encyclopedia of Rose Science* (pp. 57–66). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227620-5/00124-5>
- Roca, W. M., & Mroginski, L. A. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones* (Vol. 151). CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Rothenberger, R. R., & Starbuck, C. J. (2005). *Grafting* (MU Extension Guides, pp. 1–8) [On line]. University of Missouri Extension.  
[https://extension.missouri.edu/publications/g6971#:~:text=Home%20Grafting-,Grafting,-\(opens%20in%20new](https://extension.missouri.edu/publications/g6971#:~:text=Home%20Grafting-,Grafting,-(opens%20in%20new)
- Rout, G., Debata, B., & Das, P. (1990). *In vitro* clonal multiplication of roses. *Proc Natl Acad Sci India*, 60, 311–318.
- Rout, G., Debata, B. K., & Das, P. (1989). *In vitro* mass-scale propagation of *Rosa hybrida* cv. Landora. *Current Science*, 58(15), 876–878. JSTOR.
- Salehi, H. (1995). *In vitro propagation of miniature rose cultivars* [M.S. Thesis]. Shiraz University.

- Salehi, H., & Khosh-Khui, M. (1997). A simple procedure for disinfection of 'Baby Masquerade' miniature rose explants. *Scientia Horticulturae*, 68(1), 145–148.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(96\)00978-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(96)00978-8)
- Schneider, F. (2005). *Effect of different cultural conditions on micropropagation of rose (Rosa sp. L.) and globe artichoke (Cynara scolymus L.)*. [Dissertation, Technische Universität München].  
<https://mediatum.ub.tum.de/download/603591/603591.pdf>
- Senapati, S., & Rout, G. (2008). Study of culture conditions for improved micropropagation of hybrid rose. *Horticultural Science*, 35(1), 27–34.  
<https://doi.org/10.17221/650-HORTSCI>
- Singh, S. K., & Syamal, M. M. (1999). Critical studies on the effect of growth regulators on *in vivo* shoot proliferation in *Rosa hybrida* L cv Sonia for micropropagation. *Journal of Applied Horticulture*, 1(2), 91–93.  
<https://doi.org/10.37855/jah.1999.v01i02.06>
- Singh, S. K., & Syamal, M. M. (2001). A short pre-culture soak in thidiazuron or forchlorfenuron improves axillary shoot proliferation in rose micropropagation. *Scientia Horticulturae*, 91(1), 169–177. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(00\)00267-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00267-3)
- Skirvin, R., & Chu, M. C. (1979). *In vitro* propagation of "Forever Yours" rose. *Hortscience*, 14, 608–610.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant physiology* (5th ed.). Sinauer Associates, Inc.
- Tawfik, A. A., Ibrahim, O. H. M., Abdul-Hafeez, E. Y., & Ibrahim, S. A. I. (2018). Optimizing Micropropagation Protocol for *Rosa hybrida* cv. Eiffel Tower with Improved *in vitro* Rooting Ability. *Egyptian Journal of Horticulture*, 45(2), 323–335. <https://doi.org/10.21608/ejoh.2018.4906.1075>

- The Observatory of Economic Complexity. (2020). *Cut Flowers*. The Observatory of Economic Complexity. <https://oec.world/en/profile/hs92/cut-flowers>
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37(2), 169–180. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0031-3>
- Torre, S. (2003). MORPHOLOGY AND ANATOMY | Leaves. In A. V. Roberts (Ed.), *Encyclopedia of Rose Science* (pp. 497–504). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227620-5/00119-1>
- Tripathi, D. K., Singh, V. P., Chauhan, D. K., Prasad, S. M., & Dubey, N. K. (2014). Role of Macronutrients in Plant Growth and Acclimation: Recent Advances and Future Prospective. In P. Ahmad, M. R. Wani, M. M. Azooz, & L.-S. Phan Tran (Eds.), *Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes: Vol. II* (pp. 197–216). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8824-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8824-8_8)
- Vijaya, N., & Satyanarayana, G. (1991). Effect of Culture Media and Growth Regulators on *In vitro* propagation of Rose. In J. Prakash & R. L. M. Pierik (Eds.), *Horticulture—New Technologies and Applications* (pp. 209–214). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-3176-6\\_33](https://doi.org/10.1007/978-94-011-3176-6_33)
- Villa, R., & Arbeláez, L. (2019). Micropropagación *in vitro* de *Rosa* sp. a partir de yemas axilares y respuesta callogénica. *Revista de La Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 1(31), 10–17.
- Wissemann, V. (2003). Conventional Taxonomy (Wild Roses). In *Encyclopedia of rose science* (pp. 111–117). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.05017-2>
- Yang, S. F., & Hoffman, N. E. (1984). Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), 155–189. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.001103>

- Yildiz, M. (2012). The Prerequisite of the Success in Plant Tissue Culture: High Frequency Shoot Regeneration. In A. Leva & L. Rinaldi (Eds.), *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. Books on Demand. <https://doi.org/10.5772/51097>
- Yong, A. (2004). El cultivo del rosal y su propagación. *Cultivos Tropicales*, 25(2), 53–67. Redalyc.