



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Implementación de un protocolo para la obtención de callo *in vitro* a partir de hojas de rosas de corte (*Rosa hybrida* L.)

Autor: Helen Ronit Maldonado Pérez

Director: Ochoa Tufiño, Andrea Valeria PhD.

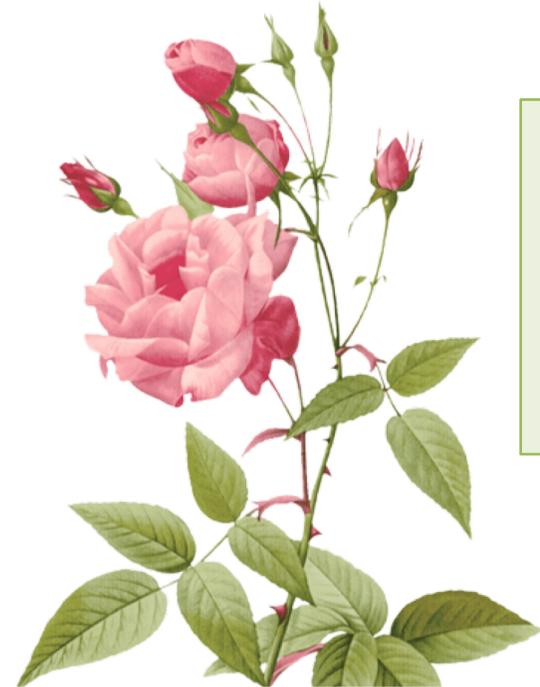
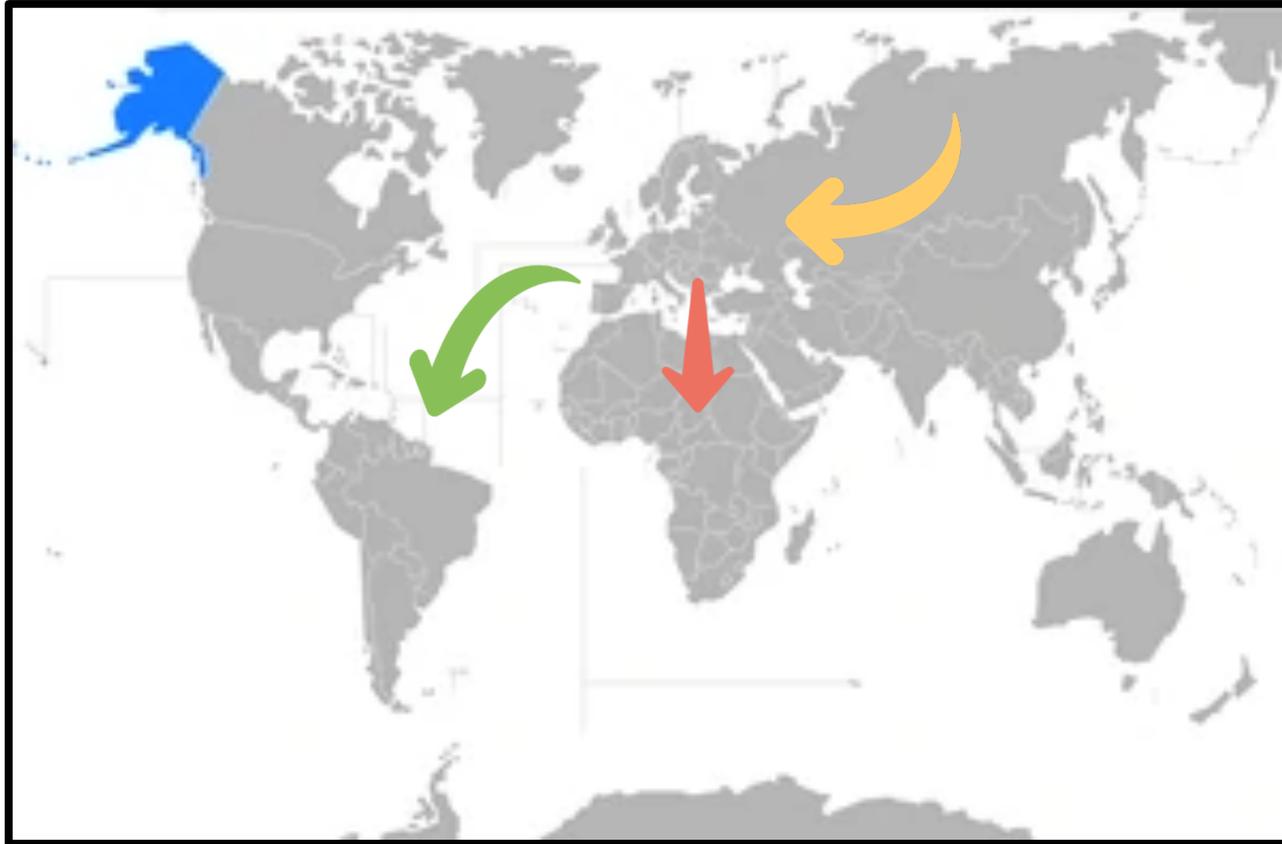
Sangolquí, 3 de agosto 2022





1	Introducción
2	Objetivos
3	Materiales y Métodos
4	Resultados y Discusión
5	Conclusiones
6	Recomendaciones
7	Agradecimientos

Origen, morfología y taxonomía de *R. hybrida* L.



Clase	Magnoliopsida
Familia	Rosaceae
Género	<i>Rosa</i> L.
Especie	<i>sp.</i> (híbrida)

Importancia económica

2021

Principales Aplicaciones

Planta Ornamental Industria Cosmética Industria del Perfume Gastronomía 

ECUADOR



+ 471
Florícolas



USD 835
Millones en
exportaciones



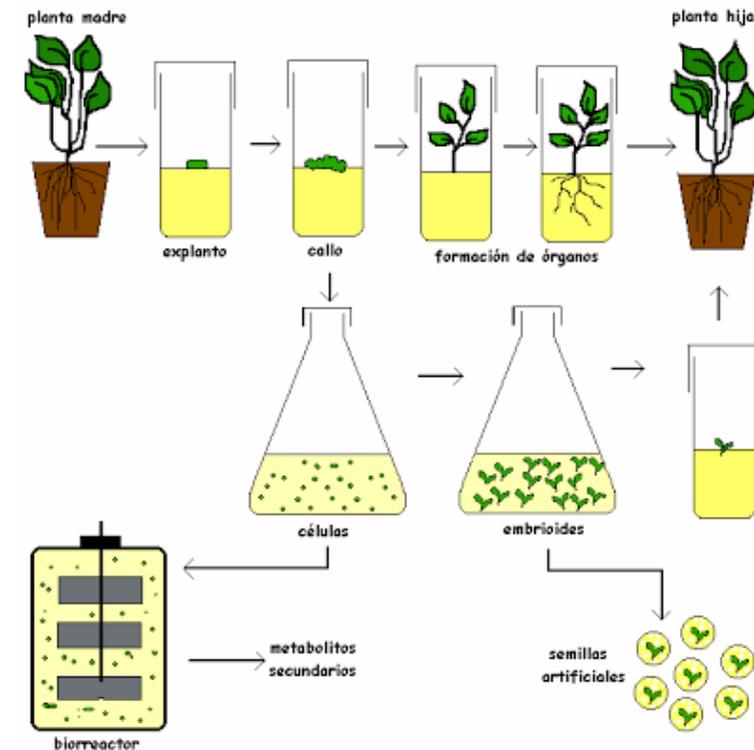
71%
Participación
en valor

Sistemas de propagación



Proceso lento y laborioso
 Porcentaje de éxito bajo
 No asegura plantas libres de enfermedades

Cultivo *in vitro*



Propagación rápida y masiva
 Alta uniformidad fenotípica
 Producción de variedades mejoradas

Objetivo General



Implementar un protocolo para la obtención de callo *in vitro* a partir de hojas de rosas de corte (*Rosa hybrida* L.).

Objetivos Específicos



Estandarizar un protocolo de desinfección para el establecimiento *in vitro* de hojas de *Rosa hybrida* L. var. CA-B19.

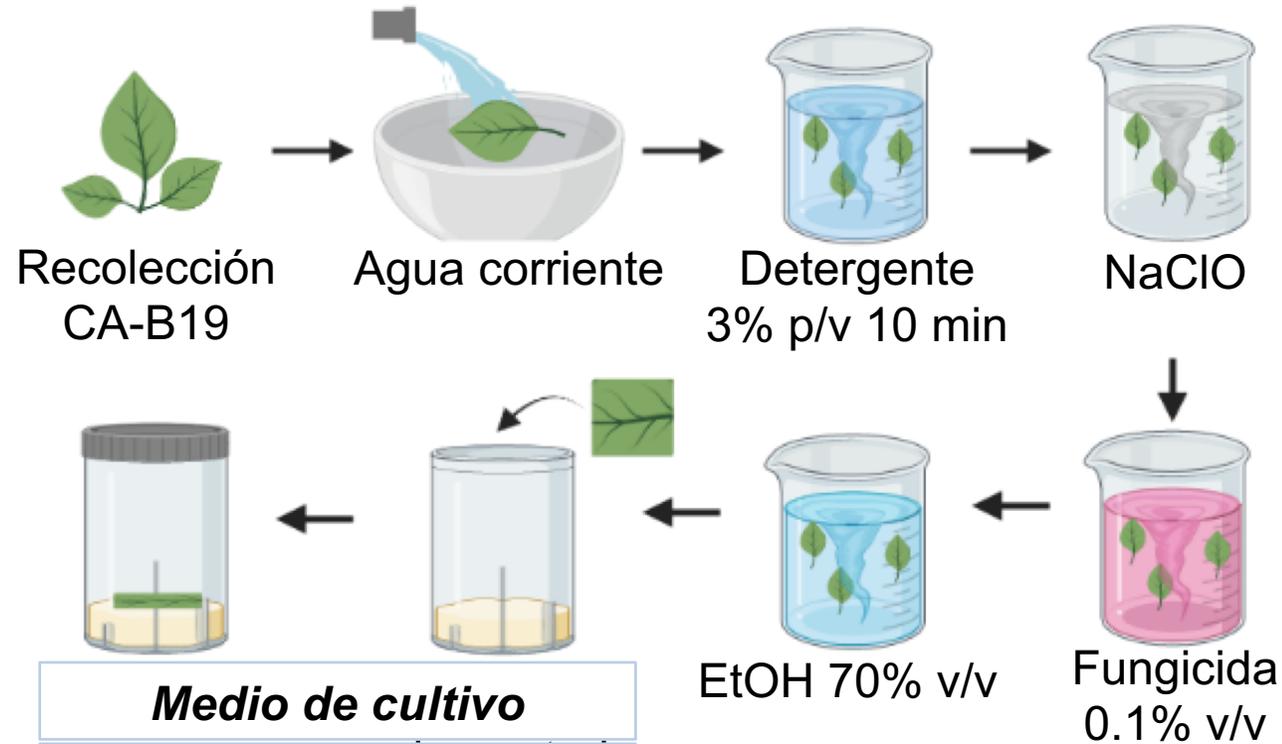


Determinar la concentración de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) óptima para la inducción de callo a partir de hojas de *Rosa hybrida* L. var. CA-B19.



Establecer las concentraciones de 6-benzilaminopurina (BAP) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) adecuadas para la proliferación de callo de hojas de *Rosa hybrida* L. var. CA-B19.

Desinfección de los explantes



Medio de cultivo

MS
 Sacarosa (30g/L)
 Agar (6.5 g/L)
 Ácido cítrico (0.1 g/L)
 pH 5.8

Condiciones ambientales

En oscuridad a 25 ± 2 °C
 por cuatro semanas.

Tratamiento	NaClO (% v/v)	Tiempo (min)
D1	0.1	15
D2	0.2	15
D3	0.1	25
D4	0.2	25

Tamaño muestral

7 explantes por repetición
 4 repeticiones
 28 explantes por tratamiento

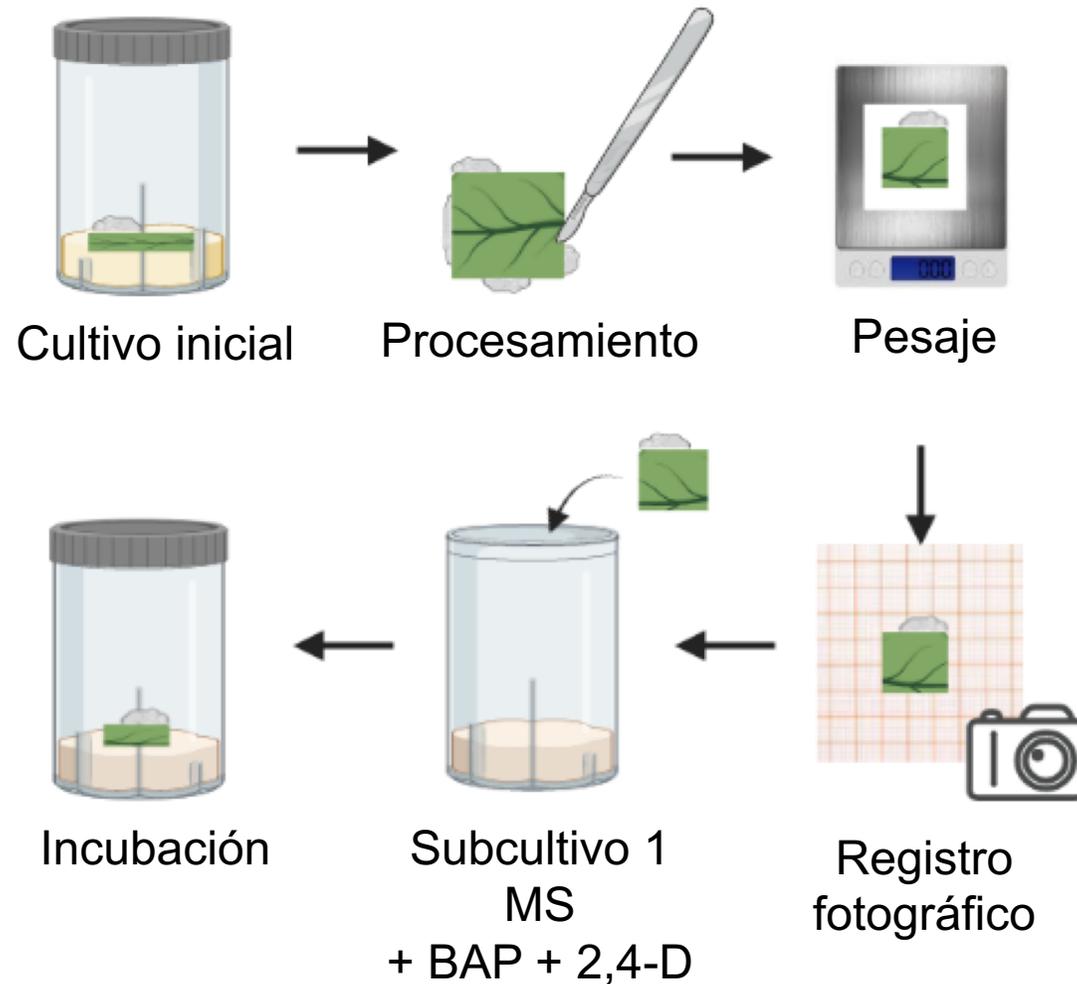


Inducción de callos



Tratamiento	2,4-D (mg/L)
I1 (Control)	0
I2	2
I3	3
I4	4

Proliferación de callos



Tratamiento	2,4-D (mg/L)	BAP (mg/L)
P1 (Control)	0	0
P2	1.5	0
P3	0	0.1
P4	1.5	0.1

Variables de respuesta

Desinfección

% Contaminación
% Necrosis
% Viabilidad
% Oxidación

Inducción de callos

% Oxidación
% Callogénesis
Número de callos inducidos por día

Proliferación de callos

% Viabilidad
Incremento de masa fresca
Incremento del área



Análisis Estadístico

Normalidad

Prueba de Shapiro Wilks



Homocedasticidad

Prueba de Levene



Diferencias significativas

ANOVA ($p < 0.05$)



Comparación múltiple de medias

Prueba de Duncan ($\alpha = 0.05$)

Correlación

Coeficiente de Spearman (ρ)

Normalidad **X**

Homocedasticidad **X**

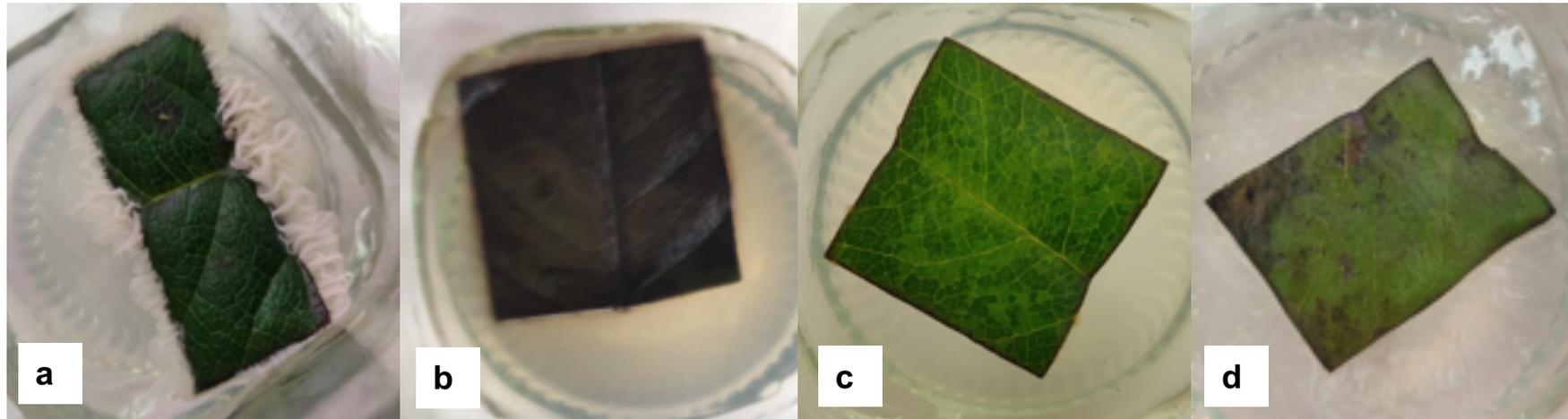
Diferencias significativas

Kruskal Wallis $p < 0.05$



Desinfección de los explantes

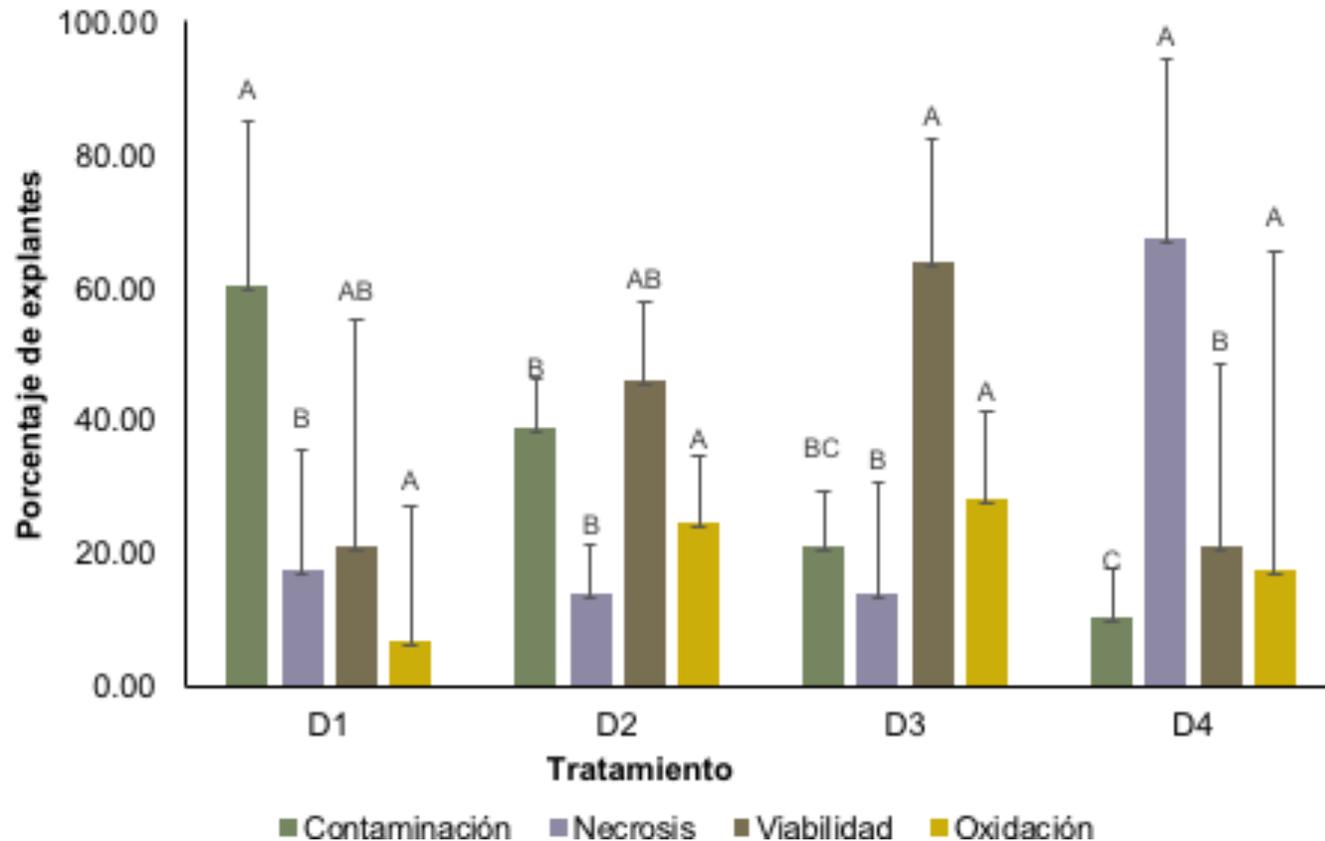
Explantes de hoja de Rosa hybrida L. var CA-B19



Nota. Explantes con (a) contaminación, (b) necrosis, (c) viabilidad y (d) oxidación.

Desinfección de los explantes

Porcentaje de contaminación, necrosis, viabilidad y oxidación en la fase de desinfección



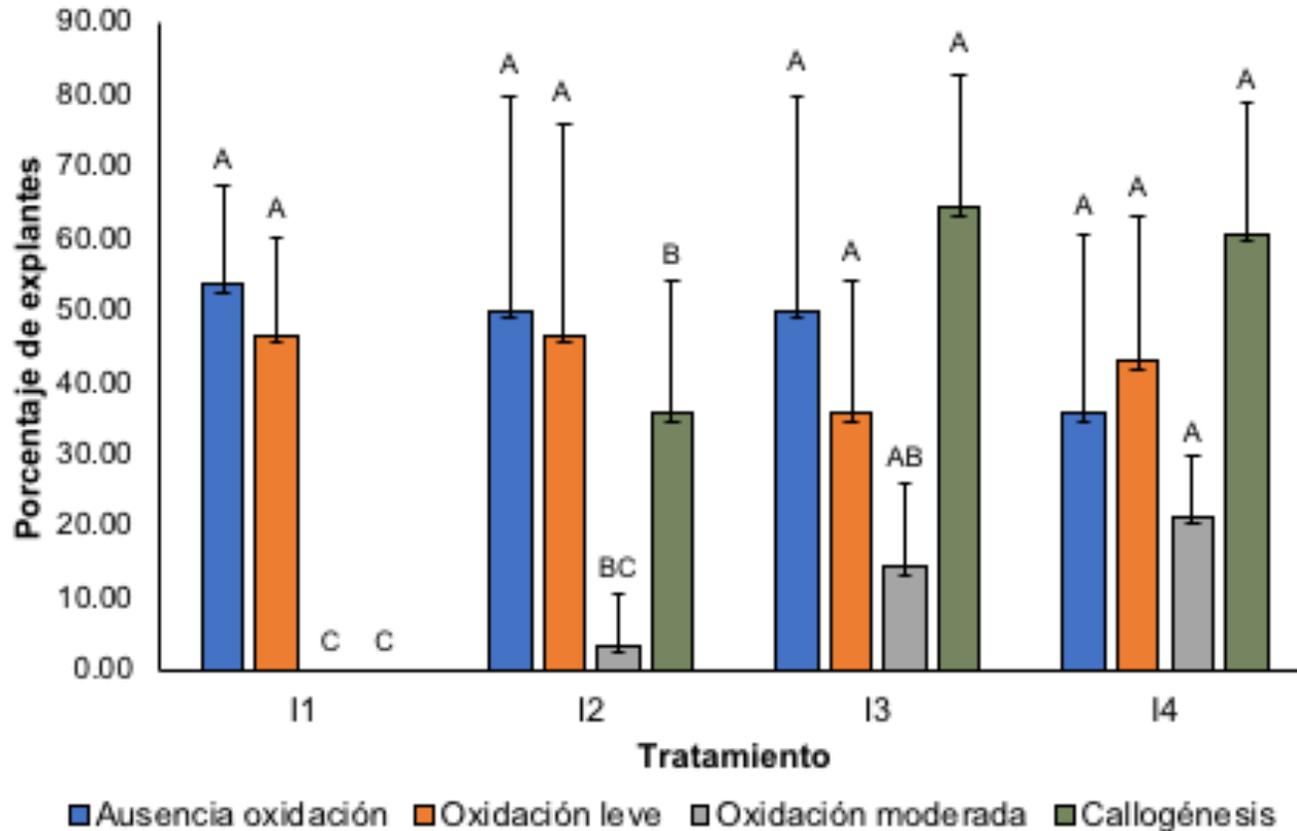
Tratamiento	NaClO (% v/v)	Tiempo (min)
D1	0.1	15
D2	0.2	15
D3	0.1	25
D4	0.2	25

Correlación de la viabilidad y los porcentajes de contaminación y necrosis de los explantes

Variable 1	Variable 2	Spearman	p
% Viabilidad	% Contaminación	-0.31	0.2461
% Viabilidad	% Necrosis	-0.69	0.0032

Etapa de Inducción de callos

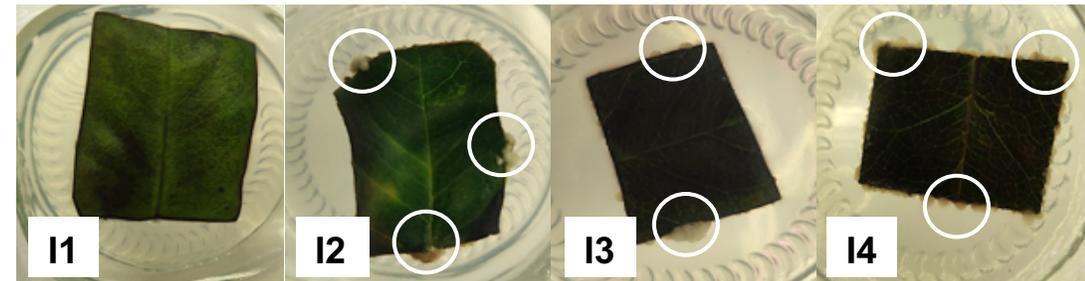
Porcentaje de oxidación y calogénesis en la fase de inducción de calogénesis



Tratamiento	2,4-D (mg/L)
-------------	--------------

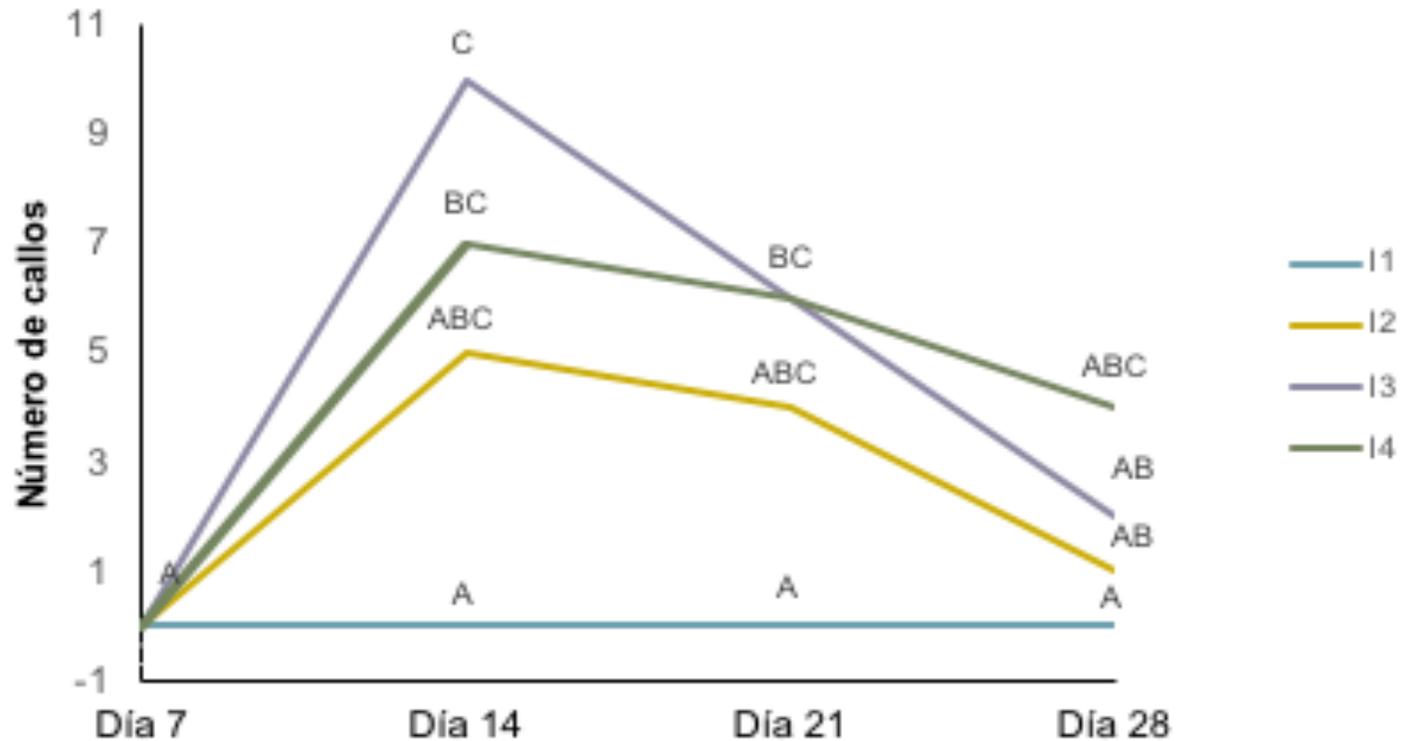
I1 (Control)	0
I2	2
I3	3
I4	4

Calogénesis en hojas de Rosa hybrida L. var CA-B19



Etapa de Inducción de callos

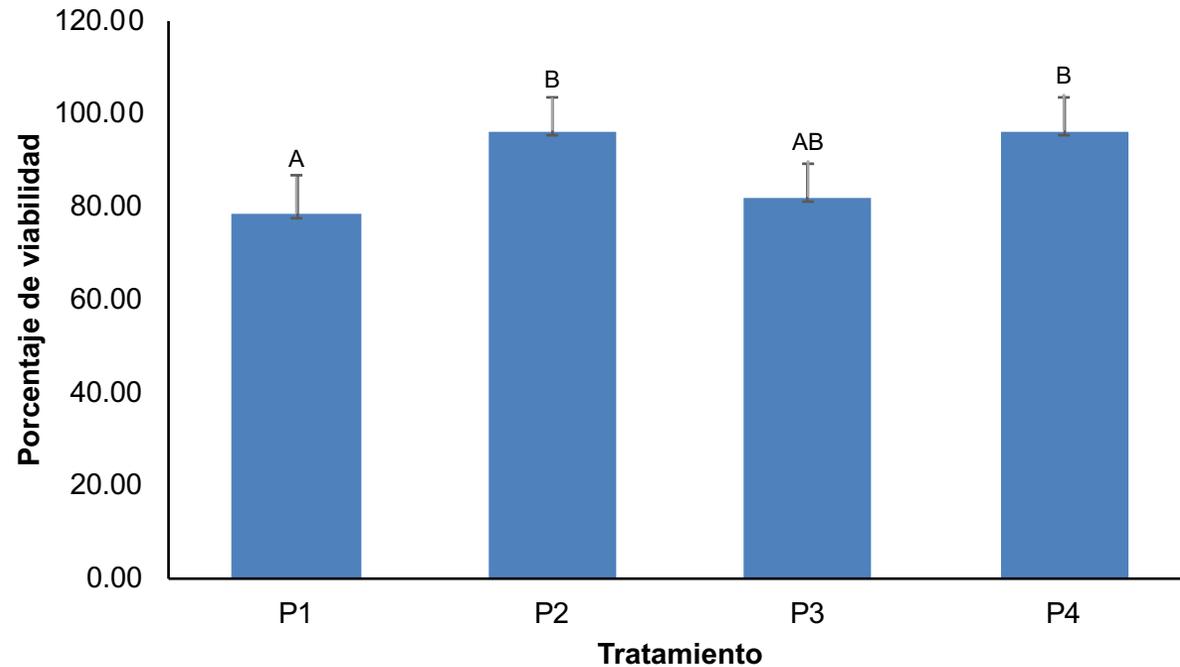
Número de callos en inducidos por día en diferentes concentraciones de 2,4-D



Tratamiento	2,4-D (mg/L)
I1 (Control)	0
I2	2
I3	3
I4	4

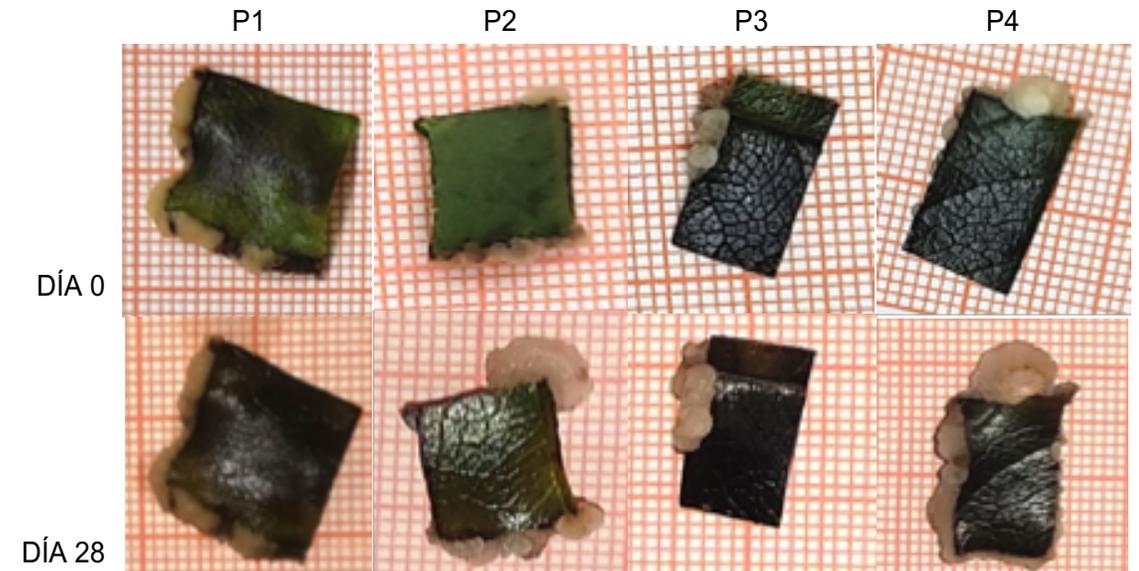
Etapa de Proliferación de callos

Porcentaje de viabilidad de los explantes durante la proliferación



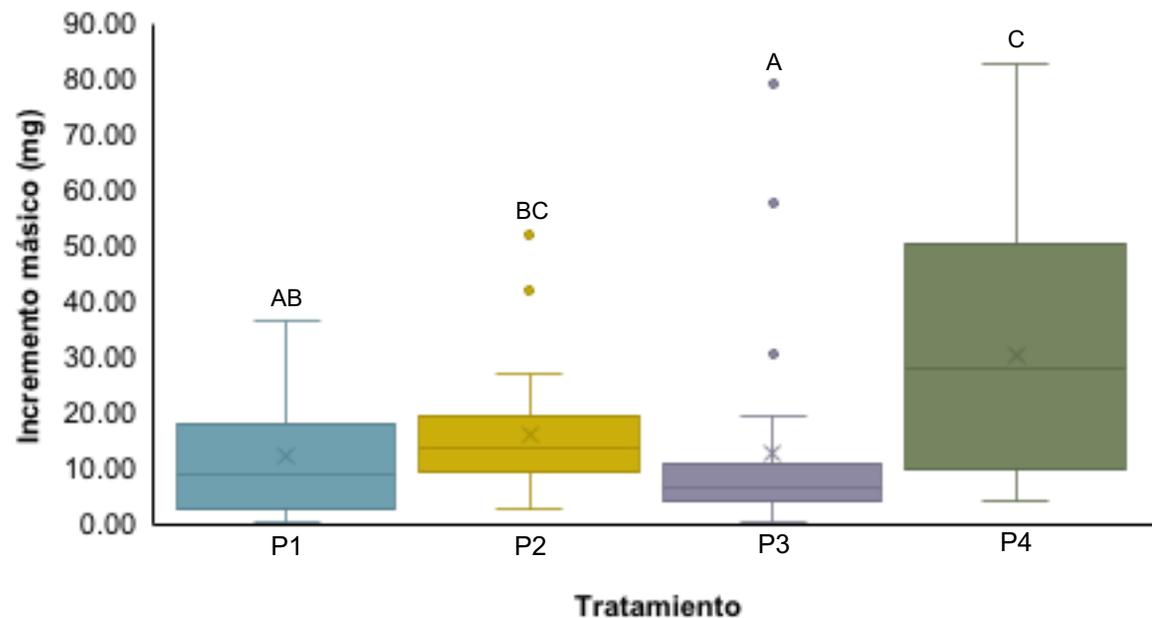
Tratamiento	2,4-D (mg/L)	BAP (mg/L)
P1 (Control)	0	0
P2	1.5	0
P3	0	0.1
P4	1.5	0.1

Proliferación de callos de hojas de *Rosa hybrida* L. var CA-B19

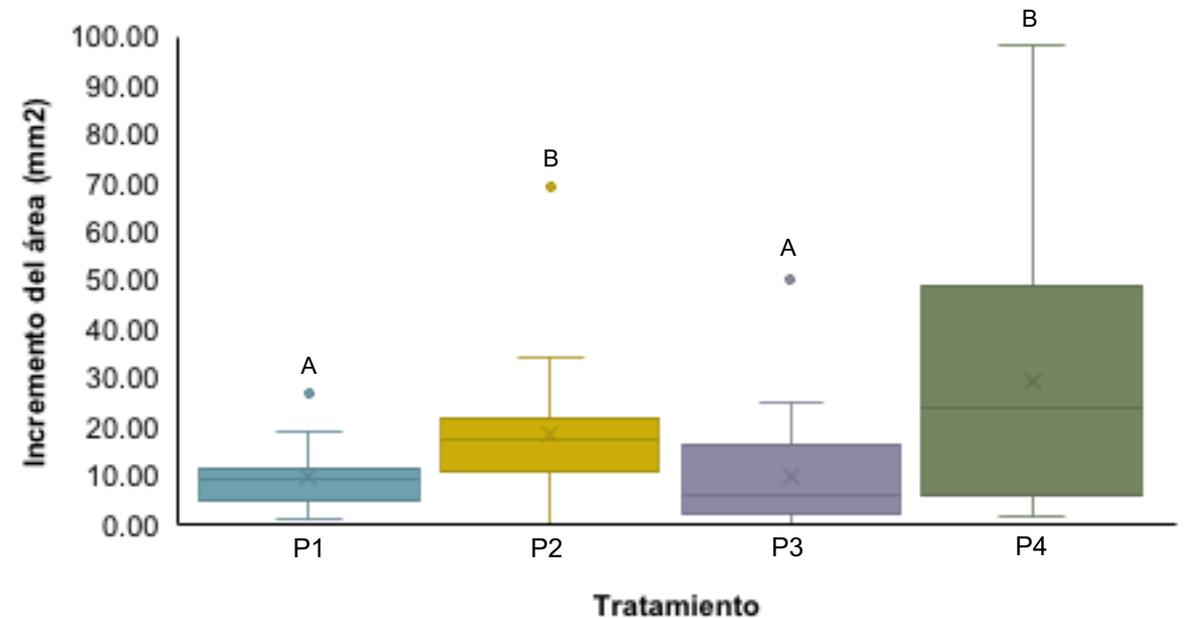


Etapa de Proliferación de callos

Incremento de la masa de callos proliferados en diferentes concentraciones de 2,4-D y BAP



Incremento del área de callos proliferados en diferentes concentraciones de 2,4-D y BAP





Se estandarizó un protocolo de desinfección con 0.1% v/v NaClO por 25 minutos de inmersión que permitió obtener una viabilidad del 64.29% durante el establecimiento *in vitro* de hojas de *Rosa hybrida* L. var. CA-B19.



Se determinó que 3 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L BAP permiten una inducción de callos del 64.29% en hojas de *Rosa hybrida* L. var. CA-B19.



Se estableció que la combinación de 1.5 mg/L 2,4-D y 0.1 mg/L de BAP es adecuada para la proliferación de callos de hojas de *Rosa hybrida* L. var. CA-B19 con una viabilidad 96.43%, un incremento de masa fresca y del área promedio de 30.69 mg y 29.54 mm², respectivamente.



En el protocolo de desinfección se recomienda incluir en el medio de cultivo ácido ascórbico como sustituto del ácido cítrico y disminuir el tiempo de inmersión en EtOH 70% a 15s para reducir la oxidación de los explantes.



Para la inducción de callos se sugiere implementar CaCl_2 o AgNO_3 en el medio de cultivo y evaluar su efecto en la friabilidad de los tejidos indiferenciados.



Se recomienda utilizar callos de siete a ocho semanas de edad y agregar aminoácidos en el medio de cultivo como la L-glutamina para mejorar el crecimiento y evitar la necrosis de los callos durante la proliferación.



Conectiflorandino Cia. Ltda

**Dean Rule, PhD.
Presidente**

**Ing. Sebastián Recalde
Jefe de Hibridación y Selección**

**Tesistas y Pasantes del
Laboratorio de Cultivo de
Tejidos Vegetales**



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Ochoa Tufiño, Andrea Valeria PhD.
Directora del proyecto**

FAMILIA Y AMIGOS