



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

Maldonado Pérez, Helen Ronit

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 Ingeniera en Biotecnología

Ochoa Tufiño, Andrea Valeria PhD.

22 de julio de 2022



Copy_leaks_Escrito_Tesis_Maldonado_H..docx

Scanned on: 3:12 July 22, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

| | |
|--------------------------|-----|
| Identical Words | 84 |
| Words with Minor Changes | 0 |
| Paraphrased Words | 222 |
| Omitted Words | 5 |

Firma:

Ochoa Tufiño, Andrea Valeria

Directora



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 para la obtención de callo *in vitro* a partir de hojas de rosas de corte (*Rosa hybrida* L.)”** fue realizado por la señorita **Maldonado Pérez, Helen Ronit**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 22 de julio de 2022

Firma:

Ochoa Tufiño, Andrea Valeria PhD

C. C. 1719478669



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Maldonado Pérez, Helen Ronit**, con C.C. 1720637345, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "**Implementación de un protocolo para la obtención de callo *in vitro* a partir de hojas de rosas de corte (*Rosa hybrida* L.)**" 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, 22 de julio de 2022

Firma:



Maldonado Pérez, Helen Ronit

C.C.: 1720637345



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Maldonado Pérez, Helen Ronit**, con C.C. 1720637345, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "**Implementación de un protocolo para la obtención de callo *in vitro* a partir de hojas de rosas de corte (*Rosa hybrida* L.)**" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 22 de julio de 2022

Firma:



Maldonado Pérez, Helen Ronit

C.C.: 1720637345

Dedicatoria

A mi madre, la mujer que más admiro en este mundo, por ser el mejor ejemplo de esfuerzo, bondad y servicialidad. Todos mis logros serán dedicados a ti siempre.

Helen Ronit Maldonado Pérez

Agradecimientos

Agradezco a la empresa Conectiflorandino Cia. Ltda. por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto de investigación y aportar el financiamiento necesario para su desarrollo.

Al Ing. Sebastián Recalde y el equipo de trabajo del laboratorio de Cultivo de Tejidos de Conectiflorandino. También, por su amistad, su apoyo y sus valiosos consejos.

A Valeria Ochoa PhD., por su gran colaboración como directora de tesis. Gracias por su tiempo, y sus aportes brindados durante la elaboración de este proyecto. Igualmente, quiero mostrar mi gratitud a todos mis profesores de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE por todas las enseñanzas impartidas.

A mi madre y a mi tío Marco por su preocupación y gran apoyo a lo largo de esta etapa de formación académica.

A Gaby, Ali, Shell y Cami por formar parte de mi vida universitaria. Gracias por tantos momentos juntas, su amistad ha significado mucho para mí.

A Sergio por su amor, comprensión y paciencia. Gracias por apoyarme y motivarme en cada momento.

Índice de contenido

| | |
|---|----|
| Resultado del análisis de Copyleaks..... | 2 |
| Certificación | 3 |
| Responsabilidad de autoría | 4 |
| Autorización de publicación | 5 |
| Dedicatoria | 6 |
| Agradecimientos | 7 |
| Índice de contenido..... | 8 |
| Listado de tablas..... | 11 |
| Listado de figuras..... | 12 |
| Listado de abreviaturas | 13 |
| Resumen..... | 14 |
| Abstract..... | 15 |
| Capítulo I: Introducción..... | 16 |
| Formulación del problema | 16 |
| Justificación del Problema | 17 |
| Objetivos | 18 |
| Objetivo General | 18 |
| Objetivos Específicos..... | 18 |
| Capítulo II: Marco teórico..... | 19 |
| Origen, morfología y taxonomía de <i>R. hybrida</i> L. | 19 |
| Importancia económica..... | 21 |
| Sistemas de propagación | 22 |

| | |
|--|----|
| Cultivo de tejidos vegetales..... | 23 |
| Morfogénesis..... | 24 |
| Medio de cultivo | 25 |
| Condiciones ambientales..... | 28 |
| Fases del cultivo <i>in vitro</i> | 28 |
| Problemas del cultivo <i>in vitro</i> | 29 |
| Hipótesis | 30 |
| Capítulo III: Materiales y métodos..... | 31 |
| Localización geográfica | 31 |
| Fase de campo | 31 |
| Selección, recolección y transporte del material vegetal | 31 |
| Fase de laboratorio..... | 31 |
| Desinfección de los explantes | 31 |
| Inducción de callogénesis..... | 33 |
| Proliferación de callos..... | 33 |
| Análisis Estadístico..... | 34 |
| Capítulo IV: Resultados | 36 |
| Desinfección de los explantes | 36 |
| Inducción de callogénesis | 38 |
| Proliferación de callo | 40 |
| Capítulo V: Discusión | 44 |
| Desinfección de los explantes | 44 |
| Inducción de callogénesis | 47 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| Proliferación de callo | 48 |
| Capítulo VI: Conclusiones | 50 |
| Capítulo VII: Recomendaciones | 51 |
| Bibliografía | 52 |
| Apéndices | 63 |

Listado de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1 Taxonomía de la rosa | 21 |
| Tabla 2 Componentes del medio de cultivo MS | 26 |
| Tabla 3 Tratamientos de desinfección de hojas de <i>Rosa hybrida</i> L. | 32 |
| Tabla 4 Tratamientos para evaluar el efecto de la concentración de 2,4-D en la inducción de callos a partir de hojas de <i>R. hybrida</i> L..... | 33 |
| Tabla 5 Tratamientos para evaluar el efecto de la concentración de BAP y 2,4-D en la proliferación de callo a partir de hojas de <i>R. hybrida</i> L..... | 34 |
| Tabla 6 Correlación de la viabilidad y los porcentajes de contaminación y necrosis de los explantes..... | 38 |

Listado de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 Morfología de la rosa..... | 20 |
| Figura 2 Explantes de hoja de <i>Rosa hybrida</i> L. var CA-B19 | 36 |
| Figura 3 Porcentaje de contaminación, necrosis, viabilidad y oxidación en la fase de desinfección | 37 |
| Figura 4 Porcentaje de oxidación y callogénesis en la fase de inducción de callogénesis .. | 39 |
| Figura 5 Callogénesis en hojas de <i>Rosa hybrida</i> L. var CA-B19..... | 39 |
| Figura 6 Número de callos en inducidos por día en diferentes concentraciones de 2,4-D... | 40 |
| Figura 7 Porcentaje de viabilidad de los explantes durante la proliferación | 41 |
| Figura 8 Incremento de la masa de callos proliferados en diferentes concentraciones de 2,4-D y BAP | 42 |
| Figura 9 Incremento del área de callos proliferados en diferentes concentraciones de 2,4-D y BAP | 42 |
| Figura 10 Proliferación de callos de hojas de <i>Rosa hybrida</i> L. var CA-B19..... | 43 |

Listado de abreviaturas

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ANA: ácido 1-naftalenacético

ANOVA: análisis de varianza

BAP: 6-bencilaminopurina

var: variedad vegetal

DE: desviación estándar

IBA: ácido 3-indol butírico

MS: Murashige y Skoog

NaClO: hipoclorito de sodio

pH: potencial de hidrógeno

RCV: Reguladores de crecimiento vegetal

Resumen

Las rosas son el producto más popular del mercado global de flores de corte. Las empresas dedicadas a la producción comercial de rosas utilizan sistemas de propagación convencionales lentos, laboriosos y que no aseguran plantas libres de enfermedades. El cultivo *in vitro* es una alternativa que permite incrementar la producción de rosas de corte, en menor tiempo, espacio y costos, así como, alta uniformidad fenotípica. La callogénesis es una herramienta del cultivo *in vitro* que permite la propagación rápida y masiva de plantas y la obtención nuevas variedades. Por tanto, la presente investigación tuvo como objetivo implementar un protocolo para la obtención de callo *in vitro* a partir de hojas de rosas de corte (*Rosa hybrida* L.), mediante la estandarización de un protocolo de desinfección con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) y tiempos de inmersión, y la determinación de las concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-benzilaminopurina (BAP) para la inducción y proliferación de callos de hojas de rosa var. CA-B19. 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 % de los explantes. Se determinó que la concentración de 2,4-D de 3 mg/L y 1 mg/L de BAP permiten una inducción de callos del 64.29%. Finalmente, se estableció que la combinación de 1.5 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de BAP es adecuada para la proliferación de callo con una viabilidad 96.43%, un incremento de masa fresca y del área promedio de 30.69 mg y 29.54 mm², respectivamente.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, *Rosa hybrida*, callogénesis, reguladores de crecimiento vegetal, proliferación.

Abstract

Roses are the most popular product in the global cut flower market. Companies dedicated to the commercial production of roses use slow, laborious and conventional propagation systems that do not ensure disease-free plants. Plant tissue culture is an alternative that allows increasing the production of cut roses, in less time, space and costs, as well as high phenotypic uniformity. Callus induction is a tissue culture tool that allows rapid and massive propagation of plants and the creation of new varieties. Therefore, the present investigation aimed to implement a protocol for obtaining *in vitro* callus from cut roses' leaves (*Rosa hybrida* L.), by standardizing a disinfection protocol with different concentrations of sodium hypochlorite (NaClO) and immersion times, and the determination of concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 6-benzylaminopurine (BAP) for the induction and proliferation of rose var. CA-B19 calluses. A disinfection protocol for leaves using 0.1% v/v NaClO for 25 minutes of immersion was standardized, 64.29% explant viability was achieved. It was determined that the concentration of 3 mg/L 2,4-D and 1 mg/L BAP allows 64.29% callus induction. Finally, it was established that the combination of 1.5 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L BAP is suitable for callus proliferation with 96.43% viability, an average fresh mass increase and area of 30.69 mg and 29.54 mm², respectively.

Keywords: tissue culture, *Rosa hybrida*, callus induction, plant growth regulators, proliferation.

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

La industria global florícola está valorada en alrededor de USD 18 billones, las flores de corte y plantas ornamentales son los principales productos de exportación de países en desarrollo, mientras que, el consumo y la demanda de nuevas variedades aumenta continuamente en países desarrollados (Fredenburgh, 2020; ITC, 2011). Las rosas son las flores de corte más comercializadas, ampliamente utilizadas en la industria alimenticia, cosmética y, principalmente, como planta ornamental debido a su agradable fragancia y a la amplia variedad de colores, tamaños y formas que presenta el botón floral (Yong, 2004).

Las técnicas de propagación del rosal más comunes se realizan a través de semillas, esquejes, injertos y acodos. El método más empleado para la producción comercial de rosas es el injerto de yema, mientras que, la reproducción por semillas se utiliza para la obtención de nuevos cultivares (Villa & Arbeláez, 2019). Los procedimientos convencionales de propagación de rosas requieren mucho tiempo y no garantizan plantas libres de enfermedades. Por lo tanto, es necesario introducir métodos eficientes para una propagación de rosas de corte más rápida (Shabbir et al., 2009).

La técnica de cultivo de tejidos vegetales se ha desarrollado como una herramienta potencial para la propagación rápida y masiva en varias especies de plantas. Presenta múltiples ventajas sobre la propagación vegetativa convencional, como la obtención de una gran cantidad de plantas libres de patógenos en poco tiempo, con alta uniformidad fenotípica y menores costos (Kharde & Kshirsagar, 2014).

En Ecuador existen varias empresas que se dedican al cultivo *in vitro* de plantas con fines comerciales (Carrera, 2019). Sin embargo, la propiedad intelectual de las empresas privadas, generalmente, se mantiene como información confidencial para proteger su ventaja competitiva (Pooley, 2013). Además, los protocolos de tejidos vegetales son específicos de la especie y debe optimizarse en función de la aplicabilidad (Shukla, 2022).

Justificación del Problema

Las rosas son el producto más popular del mercado global de flores de corte. Actualmente, los principales productores y exportadores florícolas son Países Bajos, Colombia, Ecuador, Kenia y Etiopía (Morán, 2018).

En Ecuador, la exportación de flores es la tercera actividad con mayor rubro dentro de las exportaciones no petroleras, en 2019 se registraron 8.6 miles de hectáreas de producción y se alcanzaron USD 874 millones en valor FOB, es decir, franco a bordo. Las exportaciones únicamente de rosas representaron USD 649 millones para el sector floricultor, lo que equivale al 74 % del total exportado (Expoflores, 2019). Los principales destinos de exportación son Estados Unidos, la Unión Europea y Rusia (Expoflores, 2021).

El incremento de la capacidad de propagación de las rosas es un factor esencial para fomentar la industria florícola nacional (FAREI, 2018). La técnica predominante para la producción de rosas de corte es la propagación convencional por medios vegetativos, sin embargo, desde finales de los años 80, la propagación *in vitro* ha revolucionado el negocio de los viveros comerciales (Pierik, 1987). El cultivo de tejidos permite la introducción rápida de variedades de rosas, la obtención de descendencia genéticamente similar, menor tiempo de generación de plantas libres de enfermedades, así como, el mejoramiento genético mediante el uso de tejido indiferenciado, también denominado callo (Chebet et al., 2003; Villa & Arbeláez, 2019).

La inducción de callos *in vitro* es una poderosa herramienta para la regeneración plantas en virtud de la capacidad de desdiferenciación celular y la recuperación de sus propiedades meristemáticas, incluida la rápida proliferación (Liu et al., 2018). Además, esta técnica permite la obtención nuevas variedades mediante variación somaclonal, mutagénesis, fusión de protoplastos, transferencia de organelos o ADN, entre otros (Valles & Boxus, 1987).

Debido a la gran importancia económica de las rosas, la empresa Conectiflorandino encargada de la hibridación y selección de variedades de exportación ha considerado importante realizar la determinación de las condiciones apropiadas para el desarrollo de callos, con el fin de mejorar el sistema de propagación de rosas de interés comercial y la obtención de nuevas variedades a partir de tejido indiferenciado. Por consiguiente, la presente investigación tiene el fin de implementar un protocolo para la obtención de callo *in vitro* a partir de hojas de rosas de corte (*Rosa hybrida* L.) var. CA-B19.

Objetivos

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 óptima para la inducción de callo a partir de hojas de *Rosa hybrida* L. var. CA-B19.
- Establecer las concentraciones de 6-benzilaminopurina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético adecuadas para la proliferación de callo de hojas de *Rosa hybrida* L. var. CA-B19.

Capítulo II: Marco teórico

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

Los registros fósiles muestran que la rosa es una de las flores más antiguas, su origen se remonta a Alaska, hace aproximadamente 58 millones de años. Los primeros cultivos de rosas se desarrollaron en Asia Central hace unos 5000 años. A finales del siglo XVIII las rosas cultivadas en China se introdujeron en Europa, y su cultivo se extendió por todo el hemisferio norte (Birksen, 2018). Actualmente, la producción de rosas de corte también se realiza en regiones más cálidas como Nuevo México, Irak, Etiopía y Bengala, donde la condiciones climáticas favorecen el crecimiento de las plantas (Nybom et al., 2005).

El gran interés por el cultivo y comercialización de rosas a nivel mundial se debe a sus diversas aplicaciones. Las rosas se utilizan principalmente como planta ornamental por la belleza de los botones florales y su aroma. Además, el aceite esencial de rosas es empleado ampliamente en la industria del perfume y cosmética, en aplicaciones terapéuticas y gastronómicas (Akhtar, 2009; Wang et al., 2002).

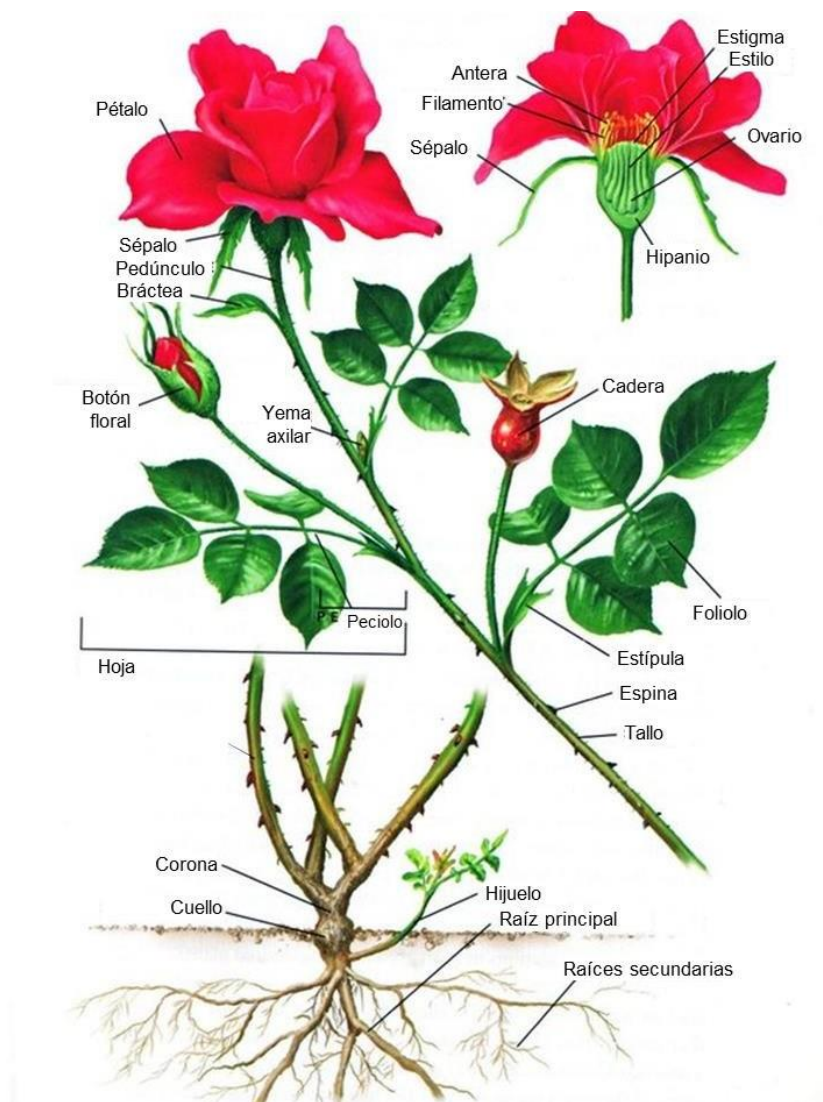
Existen múltiples especies y cultivares de rosas, American Rose Society ha clasificado a las rosas en dos clases: rosas de jardín antiguas y rosas modernas. Las rosas modernas son aquellas que se cultivaron después del debut de la rosa de té híbrida en 1867 (Marriot, 2003). A diferencia de las rosas de jardín antiguas que florecen una vez al año, las modernas florecen continuamente, presentan mayor tamaño de floración y una vida en florero más larga, sin embargo, muchas variedades carecen de fragancia y son menos resistentes a enfermedades (Vukosavljev et al., 2013).

No obstante, los múltiples cultivares de la rosa de té híbrida presentan varias características morfológicas en común. Generalmente, constan de raíces pivotantes, vigorosas y profundas, lo que permite una mayor producción y calidad de las flores respecto a otras plantas ornamentales. Presentan ramas erectas, lignificadas de color verde o rojizo en la etapa juvenil y de color pardo cuando envejecen, algunas variedades poseen espinas

en variada cantidad y forma, los tallos largos y leñosos convierten a estas rosas en una flor de corte muy popular. La hoja típica de las rosas se caracteriza por poseer superficie lisa, color verde oscuro y estar compuesta de tres, cinco o siete folíolos con bordes dentados. Las flores son completas, hermafroditas, presentan cinco pétalos o múltiplos de cinco y tienen forma de copa, puesto que, el cálamo de bordes más o menos elevados rodea al gineceo. Los frutos son aquenios, secos, muy duros e indehiscentes, aislados dentro del hipanto (Arzate et al., 2014; Weyler & Kusery, 2001; Yong, 2004).

Figura 1

Morfología de la rosa



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

Rosa hybrida es una categoría de especies compleja y artificial que se utiliza para describir los múltiples cultivares de las rosas modernas. La clasificación taxonómica de la rosa según Integrated Taxonomic Information System (2011) se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Taxonomía de la rosa

| | |
|-----------------|----------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Tracheophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Rosales |
| Familia | Rosaceae |
| Género | <i>Rosa</i> L. |
| Especie | <i>sp.</i> (híbrida) |

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

Importancia económica

Las rosas modernas poseen una gama de colores, tamaños y formas muy diversa, en consecuencia, son las flores favoritas en el mercado (Esselink et al., 2003). Ecuador es uno de los principales países productores y exportadores de rosas a nivel mundial debido a su clima ecuatorial favorable y las condiciones óptimas del suelo que permiten la producción una gran cantidad de variedades (Solano, 2020). La superficie cosechada de flores a nivel nacional en 2020 fue de 4.9 miles de hectáreas, con un decrecimiento del 48.7% respecto a 2019 ocasionado por la escasa demanda, la paralización de las jornadas laborales y los cierres de mercados debido a la pandemia por coronavirus. La especie cosechada predominante fue la rosa que concentró el 75.4% de la superficie total cosechada. Las exportaciones de flores, efectuadas hasta noviembre del 2020, alcanzaron USD 755 millones. El 70% de las exportaciones de flores realizadas fueron exclusivamente de rosas (INEC, 2021).

Las pérdidas económicas también son ocasionadas por la presencia de plagas y microorganismos patógenos que afectan negativamente la apariencia y calidad de las rosas, inclusive pueden causar su muerte, y por lo tanto, disminuir la producción para la

comercialización (Jarquín et al., 2014). Las plagas de insectos más comunes en la rosa son los pulgones y trips que se alimentan de brotes nuevos y botones florales (Iannotti, 2020). Entre las enfermedades que se presentan con mayor frecuencia se encuentran la mancha negra, el mildú polvoroso y el mildú veloso ocasionados por hongos; la agalla de corona causada por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*; el mosaico de rosas y Rose Rosette ocasionados por virus (Windham, 2019).

La obtención de plantas sanas para la propagación masiva, el mejoramiento genético y la conservación de germoplasma es esencial para evitar grandes pérdidas económicas producidas por desarrollo de enfermedades ocasionadas por plagas y microorganismos patógenos durante el cultivo de rosas (Delgado, 2012).

Sistemas de propagación

En la naturaleza, el rosal se reproduce a través de semillas, generalmente, se requiere un período de estratificación para que la planta inicie su desarrollo. Sin embargo, la tasa de germinación es baja debido a la latencia fisiológica y física que presentan (Tang et al., 2019). La reproducción por semillas de cultivares híbridos no es útil para la producción comercial de variedades, puesto que, no generan propágulos fieles al tipo, dada la existencia de un alto nivel de heterocigosidad en las especies de rosas (Samiei et al., 2021). No obstante, este método se utiliza para la obtención de nuevos cultivares y la producción de portainjertos (Horn, 1992).

Generalmente, las rosas se propagan asexualmente mediante técnicas de corte, acodo, brotación o injerto de cultivares de vástagos en patrones específicos. A nivel comercial, el método más empleado para la propagación de rosas es el injerto de yema (Chebet et al., 2003). Sin embargo, este método tradicional no es satisfactorio para la multiplicación de *Rosa* spp., pues es un proceso lento y laborioso, el porcentaje de éxito es muy bajo y no asegura plantas libres de enfermedades (Roy et al., 2004; Villa & Arbeláez, 2019).

Existen otros métodos como el cultivo de tejidos que permiten la introducción rápida de rosas, así como, la producción de variedades mejoradas por mutagénesis y selección *in vitro* (Villa & Arbeláez, 2019). Entre las técnicas del cultivo *in vitro* más empleadas para la propagación rápida y masiva de flores de corte como las rosas, se encuentran el cultivo de nodos, yemas, brotes, callos, cultivo de embriones y protoplastos (Bao et al., 2009; Jiménez, 1998).

Cultivo de tejidos vegetales

Los métodos de cultivo de tejidos se han desarrollado como una herramienta potencial para la propagación rápida y masiva en varias especies de plantas (Kharde & Kshirsagar, 2014; Wang et al., 2002).

En 1898, el botánico Gottlieb Haberlandt logró aislar células y tejidos vegetales que inoculó en soluciones nutritivas que promuevan su crecimiento, dando origen a la técnica de cultivo *in vitro*. En los años 30, White y Gautheret demostraron la posibilidad de cultivar células de plantas superiores en condiciones artificiales (Calva & Pérez, 2005).

El cultivo vegetal *in vitro* se basa en la siembra de órganos vegetativos, tejidos o células provenientes de una planta madre, inoculados en un medio nutritivo semisólido o líquido dentro de un frasco de vidrio o plástico. En condiciones de temperatura, luminosidad, humedad controladas, las células vegetales pueden multiplicarse y convertirse en un tejido vegetal específico o regenerar una planta completa (Delgado, 2012). El concepto central del cultivo de tejidos es la totipotencia, es decir, cada célula viva tiene la información genética necesaria para convertirse en un organismo completo (Khan & Shaw, 1988). Esta técnica de propagación asexual permite obtener plántulas genéticamente idénticas a la planta madre y entre sí a partir del cultivo aséptico de una sola célula vegetal (Kane, 1991).

El cultivo *in vitro* de rosas comenzó con la obtención de callos y raíces en yemas, desde entonces se han documentado diversos métodos de micropropagación de rosas simples y rápidos (Nobecourt & Kofler, 1945). En el estudio realizado por Hill (1967), se

observó la organogénesis del primer brote de rosa a partir del callo de un rosal trepador híbrido.

Existen múltiples ventajas de la micropropagación sobre los métodos convencionales, como la propagación masiva de varias especies de plantas, la disminución de espacio requerido y costos de producción, así como, la obtención de un gran número de plantas sanas a partir de una pequeña cantidad de tejido vegetal. Además, permite la hibridación de especies mediante técnicas como la fusión de protoplastos, la producción vegetal independiente del factor estacional y en un período de tiempo relativamente corto (Akhtar, 2009; Cardoso et al., 2018).

Esta tecnología, ampliamente utilizada en la agricultura moderna, permite la rápida multiplicación de nuevas variedades y la producción de flores cortadas. Además, es posible clonar hasta 400 000 plantas al año a partir de una sola rosa, debido a que las plantas micropropagadas son adecuadas por ser más compactas, se ramifican mejor y producen más flores en algunas variedades (Kharde & Kshirsagar, 2014; Pati et al., 2006). No obstante, este método presenta algunos inconvenientes como la necesidad de mano de obra calificada para realizar los procedimientos *in vitro*, variación genética y presencia de características fenotípicas indeseadas en las plantas micropropagadas, así como, la formación de raíces no funcionales *ex vitro* (Delgado, 2012).

Morfogénesis

Durante el cultivo *in vitro*, ocurre la formación de tejido indiferenciado u órganos específicos mediante el crecimiento y diferenciación celular, este proceso biológico se denomina morfogénesis vegetal (Almeida et al., 2015). Se pueden presentar diferentes tipos de morfogénesis en función de la concentración de citoquininas y auxinas en el medio de cultivo: la callogénesis, la caulogénesis y la rizogénesis (Gao et al., 2020).

La callogénesis consiste en la formación de tejido indiferenciado o callo a partir de cualquier órgano vegetal, su cultivo es la base de la inducción de brotes adventicios y la

regeneración de plantas a gran escala. Además, sirve como material de transformación genética para el mejoramiento vegetal y como sistema ideal para estudiar la diferenciación unicelular y la totipotencia (Gao et al., 2020; Pati et al., 2006). Mientras que, la caulogénesis comprende la formación de un brote adventicio, originado directamente a partir de meristemas caulinares y elongación del tallo o desarrollado de forma indirecta a partir de callos (Álvarez & Pozo, 2021). A su vez, el proceso rizogénico se basa en la formación y desarrollo de raíces adventicias a partir de un vástago, durante las etapas de inducción, iniciación y expresión (Monder & Pacholczak, 2020).

Medio de cultivo

El crecimiento y la morfogénesis de tejidos vegetales en condiciones *in vitro* requieren de nutrientes esenciales presentes en los medios de cultivo. La composición del medio incluye sales inorgánicas (macronutrientes y micronutrientes), fuentes de carbono, vitaminas, aminoácidos, reguladores del crecimiento y agentes gelificantes para la elaboración de medios de cultivo semisólidos (Espinosa-Leal et al., 2018; Sharry et al., 2015). El medio de cultivo más usado para la propagación *in vitro* de gran variedad de plantas es el medio Murashige y Skoog (1962), su composición se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2*Componentes del medio de cultivo MS*

| Compuesto químico | Cantidad (mg/L) |
|--|------------------------|
| Macro nutrientes | |
| Cloruro de calcio (CaCl ₂) | 332.02 |
| Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄) | 170.00 |
| Nitrato de potasio (KNO ₃) | 1900.00 |
| Sulfato de magnesio (MgSO ₄) | 180.54 |
| Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃) | 1650.00 |
| Micro nutrientes | |
| Cloruro de cobalto hexahidratado (CoCl ₂ .6H ₂ O) | 0.025 |
| Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO ₄ .5H ₂ O) | 0.025 |
| Etilendiamina tetraacetico férrico de sodio acido (FeNaEDTA) | 36.70 |
| Ácido bórico (H ₃ BO ₃) | 6.20 |
| Ioduro de potasio (KI) | 0.83 |
| Sulfato de manganeso hidratado (MnSO ₄ .H ₂ O) | 16.90 |
| Molibdato de sodio dihidratado (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O) | 0.25 |
| Sulfato de zinc heptahidratado (ZnSO ₄ .7H ₂ O) | 8.60 |
| Vitaminas | |
| Glicina | 2.00 |
| Myo-Inositol | 100.00 |
| Ácido nicotínico | 0.50 |
| Piridoxina HCl | 0.50 |
| Tiamina HCl | 0.10 |

Los macronutrientes como el nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, calcio y magnesio son parte estructural de diversas biomoléculas y estructuras celulares, algunos son indispensables en la fotosíntesis, la respiración y el metabolismo energético. Los micronutrientes primordiales para el crecimiento y desarrollo de las plantas son el hierro, manganeso, zinc, cobre, boro y molibdeno, generalmente, son utilizados como cofactores en diversas enzimas (Perea, 2009).

Las plantas cultivadas *in vitro* no son fotosintéticamente activas, debido la baja intensidad de luz y baja concentración de CO₂ dentro del recipiente de cultivo. Para promover la fotosíntesis en condiciones *in vitro*, la micropropagación convencional emplea sistemas heterótrofos que incluyen una fuente de carbono externa, normalmente, monosacáridos o disacáridos. La sacarosa es el azúcar más utilizado, este se hidroliza

extracelularmente a glucosa antes de ser empleado por las plantas como fuente de energía para mantener el desarrollo celular *in vitro* (Cardoso et al., 2018; Perea, 2009).

La ausencia de vitaminas y/o aminoácidos puede ser un factor limitante en el cultivo *in vitro*, por lo cual, se realiza la adición externa de estos compuestos. Las plantas sintetizan vitaminas y metabolizan aminoácidos para obtener energía que permite el crecimiento y desarrollo celular. Las vitaminas y aminoácidos más usados son: ácido ascórbico, colecalciferol, tiamina, myo-inositol y ácido nicotínico; L-glicina, L-cisteína, L-glutamina, L-prolina, L-lisina y ácido glutámico (Álvarez & Pozo, 2021).

Los reguladores de crecimiento (RCV) son sustancias químicas, obtenidas de fuentes naturales o sintetizadas, que afectan el crecimiento celular, el desarrollo y los procesos metabólicos de las plantas superiores en bajas concentraciones. Se pueden agrupar en cinco clases: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno (Prakash, 2020). Las auxinas promueven división y elongación celular, así como, la formación de raíces, las citoquininas estimulan la producción de brotes y pueden evitar el envejecimiento celular, mientras que, las giberelinas regulan la elongación del tallo. El ácido abscísico actúa como sistema de defensa contra los efectos de estrés abiótico y regula la maduración de embriones (Calva & Pérez, 2005). El etileno puede estimular la embriogénesis y en altas concentraciones puede inhibir la calogénesis (Reynolds, 1989).

El tipo de explante y el objetivo del cultivo *in vitro* determinan la consistencia del medio de cultivo, líquido o semi sólido. El empleo de un compuesto solidificante, como el agar, permite brindar a la planta un soporte, mientras que, el cultivo celular en suspensión carece de estos compuestos, debido a que requiere un movimiento continuo para la oxigenación y el crecimiento celular (Perea, 2009).

Condiciones ambientales

El desarrollo de las plantas está fuertemente condicionado por factores ambientales. Las condiciones controladas durante el cultivo *in vitro* proporcionan un entorno favorable para el crecimiento y multiplicación de los tejidos vegetales. Estas condiciones incluyen la temperatura, luz y ambiente gaseoso, así como, el suministro de nutrientes y pH del medio de cultivo (Hussain et al., 2012). En las salas de crecimiento se utiliza luz artificial como método principal para controlar la intensidad, periodicidad y calidad de la luz en las salas de crecimiento, y para el control de la temperatura, se utilizan acondicionadores de aire o calefacción (Cardoso et al., 2018).

Fases del cultivo *in vitro*

El proceso de micropropagación consta de varias fases, que incluyen la selección de la planta madre, la introducción del explante en un medio de cultivo, la multiplicación, el enraizamiento y la aclimatación (Monthony et al., 2021; Murashige, 1974).

En la fase 0 se realiza la selección de la planta madre. Se escoge una o varias plantas donadoras sanas, vigorosas y que presenten un estado fisiológico óptimo para extraer el material vegetal de interés (Perea, 2009).

En la fase I se procede con la introducción de explantes al medio de cultivo. Este procedimiento consiste en desinfectar y cultivar asépticamente los fragmentos vegetales o explantes obtenidos en un medio de cultivo inicial que permita el desarrollo celular bajo determinadas condiciones ambientales. Generalmente, los explantes cultivados producen nuevos brotes o vástagos (Hussain et al., 2012).

En la fase II se lleva a cabo la multiplicación. Los brotes originados durante el cultivo mediante embriogénesis somática, propagación clonal u organogénesis pueden ser extraídos y subcultivados en medio fresco donde se puede reiniciar un nuevo ciclo de multiplicación para obtener un gran número de plantas en un tiempo determinado, en

función de la especie y las condiciones artificiales utilizadas durante el cultivo (Hussain et al., 2012; Monthony et al., 2021). Los brotes axilares y adventicios pueden presentar formación de raíces durante la fase de multiplicación, dependiendo de la especie.

En la fase III se induce el enraizamiento de los brotes. La formación de raíces normalmente se produce en un medio específico con mayor relación auxinas-citoquininas, las plántulas deben ser sometidas a prolongados periodos de oscuridad para mejorar su comportamiento *ex vitro* (Perea, 2009).

En la fase IV se realiza la aclimatación. Las plántulas desarrolladas *in vitro* se transfieren a un invernadero en sustrato estéril y se monitorean los procesos fisiológicos que sufren las plántulas para la adaptación a las condiciones ambientales *ex vitro* con el fin de proporcionar estabilidad en campo (Nizamani et al., 2016).

Problemas del cultivo in vitro

La presencia de microorganismos no deseados en los explantes o el medio de cultivo es uno de los principales problemas durante el cultivo *in vitro*. Los hongos y las bacterias compiten con las células vegetales para obtener los nutrientes del medio, liberan desechos tóxicos que impiden el crecimiento o desarrollo celular y, en última instancia, ocasionan la muerte de los explantes. La contaminación puede ser de origen endófito, cuando los microorganismos se encuentran en los tejidos de la planta, o inducido, cuando se debe a la manipulación del tejido vegetal durante el establecimiento (Pérez-Álvarez et al., 2016).

En ocasiones, la oxidación fenólica también representa un grave problema para el desarrollo y crecimiento de los explantes. Diferentes tipos de estrés, como el daño mecánico del explante o la senescencia, generan un incremento de las especies reactivas de oxígeno y una pérdida de la capacidad antioxidante (Zenil et al., 2014). Como consecuencia, ocurre la liberación de enzimas polifenol oxidasas, que en conjunto con tirosina o fenoles, producen quinonas. Estos exudados tóxicos provocan el oscurecimiento

de los explantes y el pardeamiento oxidativo del medio de cultivo que inicia en las zonas cercanas al explante y puede extenderse por todo el medio (Álvarez & Pozo, 2021).

Además, ocasiona deficiencias en la absorción de nutrientes y la muerte celular o necrosis.

Existen tratamientos con carbón activado, ácido cítrico y ácido ascórbico para controlar el pardeamiento (Akhtar, 2009; Zenil et al., 2014).

Hipótesis

- El protocolo implementado permite la obtención de callo *in vitro* a partir de hojas de *Rosa hybrida* L. var. CA-B19.
- El protocolo implementado no permite la obtención de callo *in vitro* a partir de hojas de *Rosa hybrida* L. var. CA-B19.

Capítulo III: Materiales y métodos

Localización geográfica

La investigación se realizó en la empresa Conectiflorandino Cia. Ltda., finca número 2 de Rosaprima, ubicada en el sector de Guachalá del cantón Cayambe, provincia de Pichincha, latitud de 0°00'07.1"S y longitud de 78°28'00.3"W.

Fase de campo

Selección, recolección y transporte del material vegetal

El material vegetal utilizado en esta investigación se obtuvo de plantas donadoras mayores de un año, cultivadas en invernadero y fenotípicamente sanas. Se recolectaron hojas juveniles de *Rosa hybrida* L. var. CA-B19 de 3 a 5 cm de longitud, sin espinas ni lesiones visibles en el haz y envés. Inmediatamente, las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales en recipientes de vidrio con agua destilada cerrados herméticamente.

Fase de laboratorio

Desinfección de los explantes

En la primera etapa, la desinfección de las hojas inició con un lavado en agua corriente del haz y envés, seguido por una solución de detergente comercial (3% p/v), durante 10 minutos para la remoción superficial de impurezas, seguido de tres lavados con agua destilada, por un minuto cada uno. Posteriormente, se realizó la inmersión en una solución de hipoclorito de sodio en diferentes concentraciones y tres gotas de Tween 20. Se evaluaron dos concentraciones de hipoclorito de sodio y dos tiempos de inmersión, generando los cuatro tratamientos de desinfección que se muestran en la Tabla 3. Se implementó un diseño experimental factorial 2x2. La unidad experimental en esta etapa fue un segmento de hoja por frasco. Se utilizaron siete explantes por tratamiento, los cuales se ejecutaron por cuadruplicado.

Tabla 3

Tratamientos de desinfección de hojas de Rosa hybrida L.

| Tratamiento | Concentración de NaClO (% v/v) | Tiempo de inmersión (minutos) |
|--------------------|---|--|
| D1 | 0.1 | 15 |
| D2 | 0.2 | 15 |
| D3 | 0.1 | 25 |
| D4 | 0.2 | 25 |

Tras eliminar el hipoclorito con tres lavados con agua destilada estéril, un minuto por lavado, se aplicó una solución fungicida. En la cámara de flujo laminar o vertical, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril, por un minuto cada lavado, y una inmersión en etanol (70% v/v). Una vez eliminado el etanol mediante de tres lavados con agua destilada estéril, con una duración de 1 minuto por lavado, se mantuvieron los explantes en agua destilada estéril. Finalmente, se eliminaron los bordes de las hojas y las partes oxidadas hasta obtener explantes con dimensiones de 2 cm x 2 cm, aproximadamente.

Los explantes se sembraron en frascos de vidrio en medio MS, cuya composición se muestra en la Tabla 2, suplementado con ácido cítrico 100 mg/L, sacarosa (3 % p/v) y agar (0.65 % p/v). Se ajustó el pH del medio de cultivo a 5.8 con hidróxido de potasio (KOH) 1 N o ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1 N, y se esterilizó en autoclave a 121 °C a una presión de 1.06 kg/cm² durante 15 minutos. La incubación del material vegetal se realizó en la sala de crecimiento a 25 ± 1°C en oscuridad. Al culminar la etapa se descartó el material vegetal.

Las variables de respuesta evaluadas en esta fase tras cuatro semanas de cultivo fueron: porcentaje de contaminación, presencia de bacterias u hongos; oxidación, oscurecimiento del 25 al 75 % del área de los explantes y pardeamiento del medio de cultivo; necrosis, oscurecimiento del área de los explantes mayor al 75%; y viabilidad, explantes no contaminados ni necrosados.

Inducción de callogénesis

Se recolectaron hojas de *Rosa hybrida* L. var. CA-B19 y se desinfectaron con el protocolo D3 detallado previamente. Los explantes de hoja desinfectados, se inocularon en medio de cultivo MS suplementado, descrito anteriormente, enriquecido 1 mg/L de BAP y cuatro concentraciones de 2,4-D detalladas en los tratamientos de la Tabla 4. Se implementó un diseño experimental factorial 2x2. La unidad experimental fue un segmento de hoja por frasco. Se utilizaron siete explantes por tratamiento, los cuales se ejecutaron por cuadruplicado. Las condiciones de temperatura y luz, previamente especificadas, se mantuvieron durante la incubación de los explantes en la presente etapa.

Tabla 4

Tratamientos para evaluar el efecto de la concentración de 2,4-D en la inducción de callos a partir de hojas de R. hybrida L.

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

Las variables de respuesta examinadas durante las cuatro semanas de cultivo fueron: el porcentaje de callogénesis, presencia de callo en los explantes; el día de inducción, aparición de callos en los días 7, 14, 21 y 28 tras la inoculación del explante en el medio de cultivo; y el porcentaje de oxidación, oscurecimiento de los explantes y pardeamiento del medio del cultivo. Esta última variable se evaluó en tres niveles: ausencia de oxidación; oxidación leve, oscurecimiento del 10 al 35% del área de los explantes; y oxidación moderada, oscurecimiento del 36% al 60% del área de los explantes.

Proliferación de callos

En la presente etapa, se eliminaron las partes oxidadas de los explantes cultivados en la etapa de inducción y se cortaron segmentos de hoja con callos de 1 cm x 1 cm y una

masa entre 25 a 100 mg. Se sembraron los explantes en el medio de cultivo MS suplementado, descrito en la etapa de establecimiento, enriquecido con diferentes concentraciones de BAP y 2,4-D. Los cuatro tratamientos para evaluar el efecto de la concentración de los RCV en la proliferación de callo se presentan en la Tabla 5. Se implementó un diseño experimental factorial 2x2. La unidad experimental fue un segmento de hoja con callos por frasco. Se utilizaron siete explantes por tratamiento, los cuales se ejecutaron por cuadruplicado. Las condiciones de temperatura y luz, previamente especificadas, se mantuvieron durante la incubación de los explantes en la presente etapa.

Tabla 5

Tratamientos para evaluar el efecto de la concentración de BAP y 2,4-D en la proliferación de callo a partir de hojas de R. hybrida L.

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

Las variables de respuesta evaluadas después de cuatro semanas de cultivo fueron: la viabilidad, explantes que no presentaron necrosis a simple vista; el incremento de la masa fresca, diferencia entre la masa fresca inicial y final de los explantes pesados con una balanza de precisión; y el incremento del área de callo, diferencia promedio del área inicial y final de haz y envés de los explantes, las áreas fueron obtenidas mediante el análisis de imágenes en el programa Image J.

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software InfoStat v. 2018 y Microsoft Excel v.16.16.27. Se aplicaron los criterios de normalidad (prueba de Shapiro-Wilks $p > 0.05$) y homocedasticidad (Prueba de Levene) en las variables continuas. Las variables respuesta en la fase de desinfección que cumplieron los criterios en cada etapa

fueron: el porcentaje de contaminación, necrosis, oxidación y viabilidad normalizada con la transformación a potencia cuadrada. En la fase de inducción de callogénesis las variables normales fueron: el porcentaje de callogénesis, ausencia de oxidación, oxidación leve y oxidación moderada de los explantes. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) de las variables mencionadas y en caso de encontrar una diferencia significativa ($p < 0.05$), se procedió con una comparación de medias múltiple (prueba de Duncan $\alpha = 0.05$). La correlación entre la contaminación, necrosis y viabilidad de la fase de desinfección se analizó empleando el coeficiente de correlación de Spearman. Para constatar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos, cuando la variable continua no cumplía la condición de normalidad, se utilizó la variante de análisis no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis).

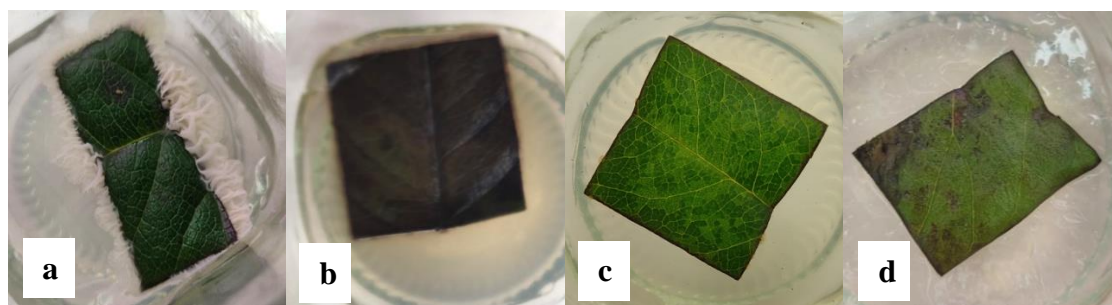
Capítulo IV: Resultados

Desinfección de los explantes

En la presente fase se evaluaron cuatro tratamientos de desinfección con dos concentraciones de NaClO (0.1 y 0.2% v/v) y dos tiempos de inmersión (15 y 25 minutos). El porcentaje de contaminación, necrosis, viabilidad y oxidación de los explantes fueron evaluados a la cuarta semana de cultivo (Figura 2).

Figura 2

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

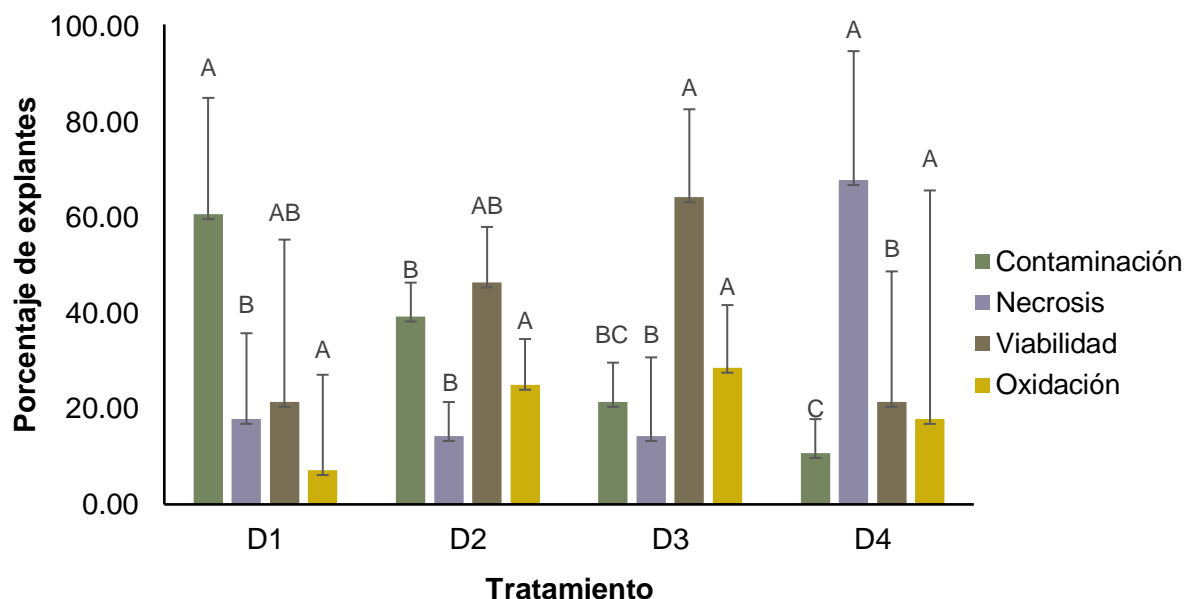


Nota. Explantes con (a) contaminación, (b) necrosis, (c) viabilidad y (d) oxidación.

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza (ANOVA) mostraron que los tratamientos de desinfección aplicados presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el porcentaje de contaminación, necrosis y viabilidad de los explantes. Sin embargo, la prueba ANOVA evidenció que no hay diferencias significativas entre la oxidación de los explantes obtenidos en cada tratamiento. Además, la prueba de Duncan permitió la comparación de medias de cada tratamiento, mostrando que, el tratamiento D4 (0.2% v/v NaClO y 25 min de inmersión) es el tratamiento que presentó el menor porcentaje de contaminación, 10.71% y el mayor porcentaje de necrosis, 67.86% (Anexo 1). Mientras que, D3 (0.1% v/v NaClO y 25 min de inmersión), fue el tratamiento que tuvo la mayor viabilidad, 64.29%. La oxidación fue superior al 7% en los cuatro tratamientos aplicados, sin embargo, las medias no presentaron diferencias significativas (Figura 3).

Figura 3

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



Nota. Variables evaluadas para cada tratamiento con dos concentraciones de NaClO (% v/v) y dos tiempos de inmersión (min): D1 (0.1:15), D2 (0.2:15), D3 (0.1:25) y D4 (0.2:25). El tamaño muestral para cada tratamiento $n = 28$. Medias con una letra común no son significativamente diferentes según las pruebas ANOVA ($p > 0.05$) y Duncan ($\alpha = 0.05$).

Los porcentajes de contaminación y necrosis presentaron una correlación decreciente con la viabilidad de los explantes durante la etapa de desinfección (Tabla 6). El coeficiente de Spearman (ρ) constató que el porcentaje de contaminación y la viabilidad de los explantes tienen una relación decreciente ($\rho = -0.69$), al igual que, el porcentaje de necrosis ($\rho = -0.29$). No obstante, para la correlación de viabilidad y necrosis $p > 0.05$, por lo que, la confiabilidad fue baja. En base a los resultados se determinó que la supervivencia de los explantes fue negativamente afectada por el incremento de la contaminación y necrosis de los explantes.

Tabla 6

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

| Variable 1 | Variable 2 | n | Spearman | p |
|-------------------|-------------------|----------|-----------------|----------|
| % Viabilidad | % Contaminación | 16 | -0.31 | 0.2461 |
| % Viabilidad | % Necrosis | 16 | -0.69 | 0.0032 |

Inducción de callogénesis

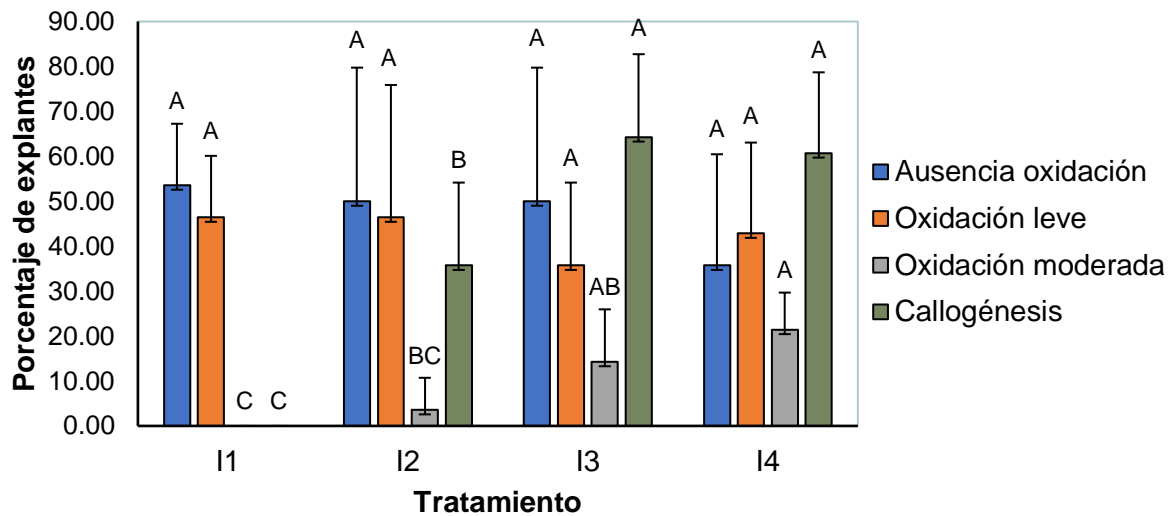
En esta fase se evaluó el efecto de 1 mg/L BAP y diferentes concentraciones de 2,4-D (0, 2, 3 y 4 mg/L) en el porcentaje de callogénesis, la semana de inducción y el porcentaje de oxidación de los explantes, evaluados durante cuatro semanas de cultivo.

La prueba ANOVA evidenció que las medias de los tratamientos presentaron diferencias significativas en el porcentaje de oxidación moderada de los explantes. La comparación de medias múltiple mostró que únicamente el porcentaje de oxidación moderada presenta diferencias significativas, siendo la concentración de 4 mg/L de 2,4-D el tratamiento que presentó el mayor nivel de oxidación de los explantes, 21.43 % (Figura 4).

Se comprobó la existencia de diferencias significativas entre porcentajes de callogénesis obtenidos, asociados a la concentración de 2,4-D, según la prueba de Kruskal Wallis ($p > 0.05$). El mayor porcentaje de callo inducido fue del 64.29% en el tratamiento I3 con una concentración de 3 mg/L de 2,4-D (Anexo 2). La callogénesis a partir de hojas se observó en los tratamientos I2, I3 e I4, mientras que en el tratamiento I1 no se produjo la formación de callos (Figura 5).

Figura 4

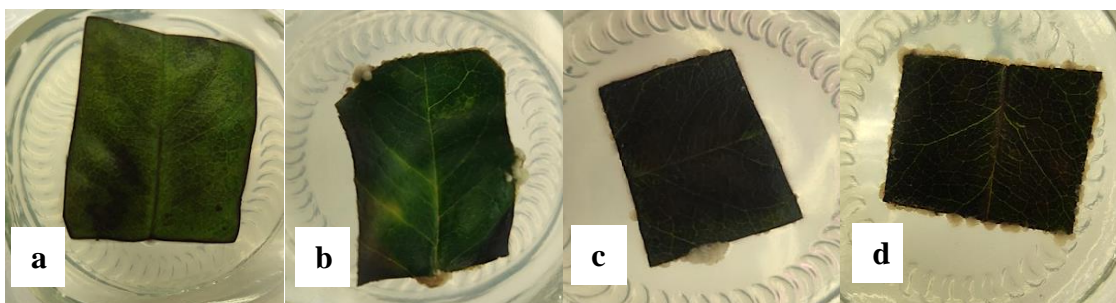
Porcentaje de oxidación y callogénesis en la fase de inducción de callogénesis



Nota. Variables evaluadas para cada tratamiento con diferentes concentraciones de 2,4-D: I1(control), I2 (2 mg/L), I3 (3 mg/L) e I4 (4 mg/L). El tamaño muestral para cada tratamiento $n = 28$. Medias con una letra común no son significativamente diferentes según las pruebas ANOVA ($p > 0.05$) y Duncan ($\alpha = 0.05$).

Figura 5

Callogénesis en hojas de *Rosa hybrida* L. var CA-B19

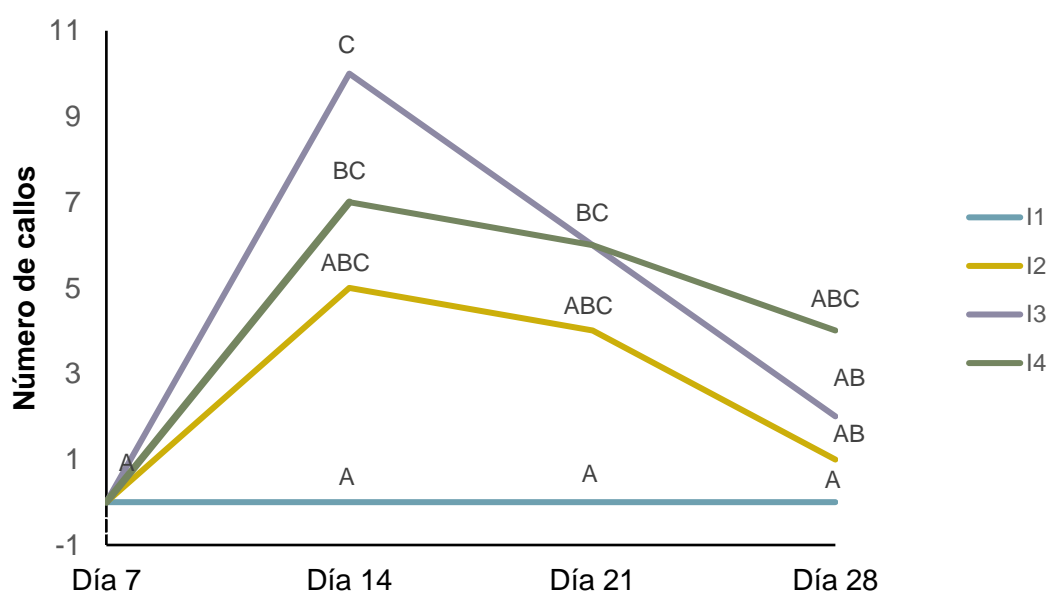


Nota. Explantes a las cuatro semanas de cultivo para cada tratamiento con diferentes concentraciones de 2,4-D: (a) I1(control), (b) I2 (2 mg/L), (c) I3 (3 mg/L) y (d) I4 (4 mg/L).

Además, la prueba de Kruskal Wallis mostró que existen diferencias significativas entre el número de callos inducidos asociados a la concentración de 2,4-D ($p < 0.05$). De este modo, en la Figura 6 se observa que el día 14 existió un mayor número de callos inducidos en los tratamientos I3 e I4.

Figura 6

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



Nota. Callos inducidos por cada tratamiento con diferentes concentraciones de 2,4-D: (a) I1 (control), (b) I2 (2 mg/L), (c) I3 (3 mg/L) y (d) I4 (4 mg/L). El tamaño muestral para cada tratamiento $n = 28$. Medias con una letra común no son significativamente diferentes según la prueba de Kruskal Wallis ($p > 0.05$).

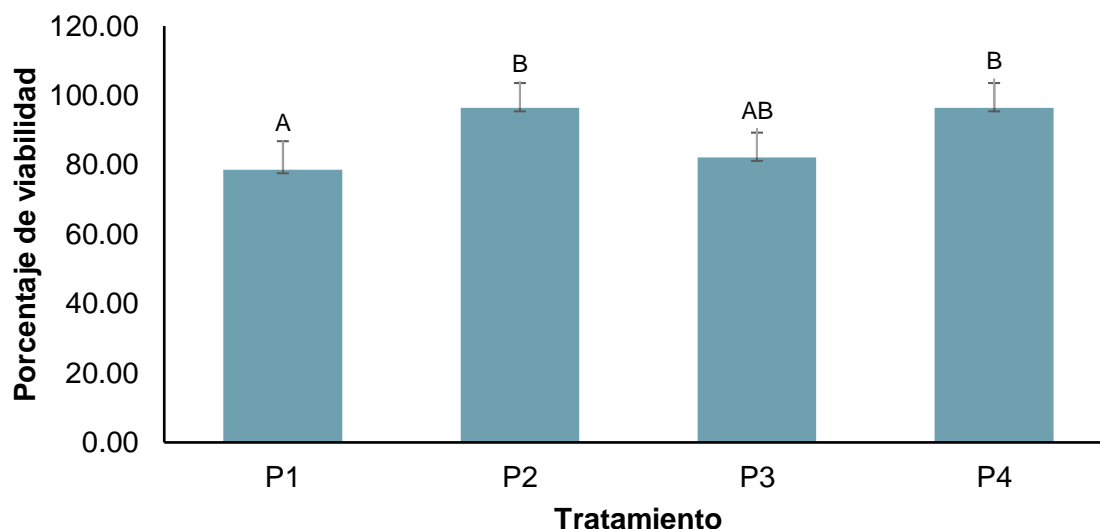
Proliferación de callo

En esta etapa se evaluó el efecto entre 2,4-D (0, 1.5 mg/L) y BAP (0, 0.1 mg/L) en la necrosis, la viabilidad, el incremento másico y el incremento del área de los callos.

Se constató que existen diferencias significativas entre los tratamientos de proliferación ejecutados según la prueba de Kruskal Wallis. Los tratamientos P2 y P4 son presentaron el mayor porcentaje de viabilidad durante esta etapa, 96.43% (Figura 7).

Figura 7

Porcentaje de viabilidad de los explantes durante la proliferación



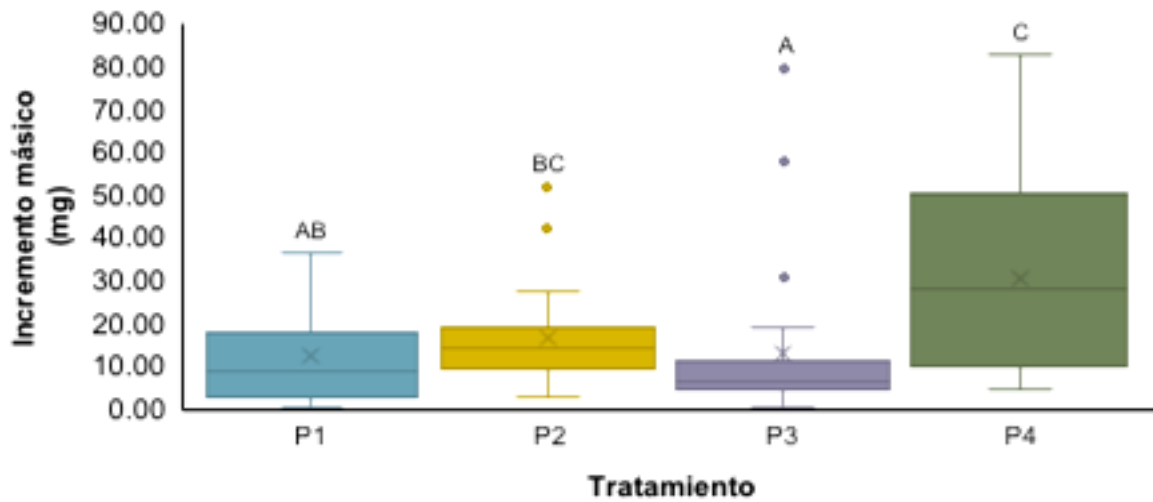
Nota. Variable evaluada para cada tratamiento con diferentes concentraciones de 2,4-D y BAP (mg/L): P1(control), (b) P2 (1.5:0), P3 (0:0.1) y P4 (1.5:0.1). El tamaño muestral para cada tratamiento $n = 28$. Medias con una letra común no son significativamente diferentes según la prueba de Kruskal Wallis ($p > 0.05$).

Los tratamientos influyeron significativamente en el aumento de la masa fresca y el área de los callos, según indicó la prueba de Kruskal Wallis. La combinación de 1.5 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de BAP, tratamiento P4, presentó el mayor incremento de la masa respecto al resto de tratamientos, 30.69 ± 22.20 mg (Anexo 3), mientras que, P4 generó el mayor aumento del área de 29.54 ± 26.01 mm², aunque la media no presentó diferencias significativas con el tratamiento P3 (Figura 8 y 9). Los resultados de los análisis estadísticos

son concordantes con lo observado en la Figura 10 donde se aprecia que los callos presentaron mayor crecimiento en los tratamientos P2 y P4.

Figura 8

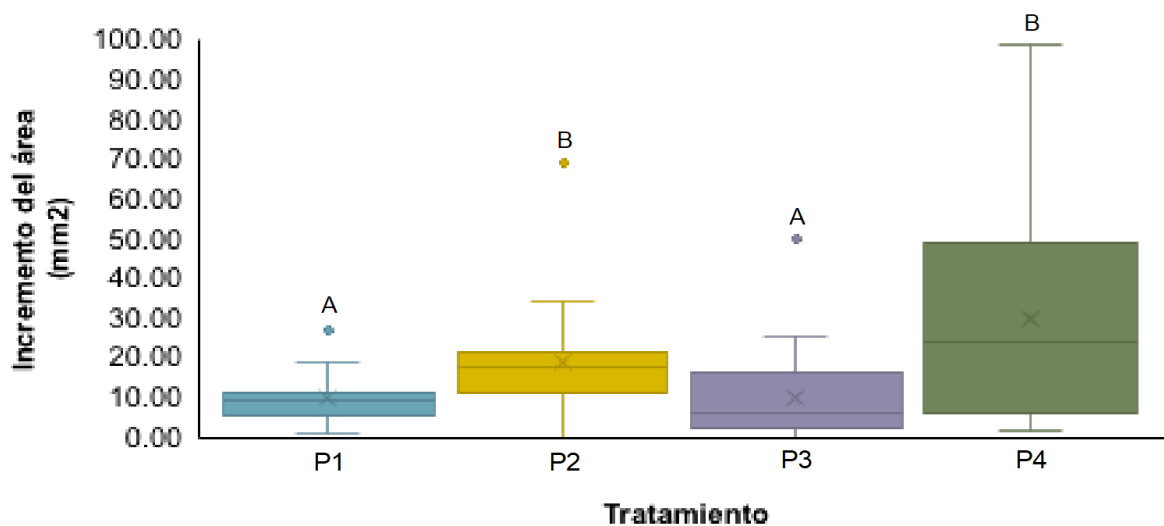
Incremento de la masa de callos proliferados en diferentes concentraciones de 2,4-D y BAP



Nota. Variable evaluada para cada tratamiento con diferentes concentraciones de 2,4-D y BAP (mg/L): P1(control), (b) P2 (1.5:0), P3 (0:0.1) y P4 (1.5:0.1). Medias con una letra común no son significativamente diferentes según la prueba de Kruskal Wallis ($p > 0.05$).

Figura 9

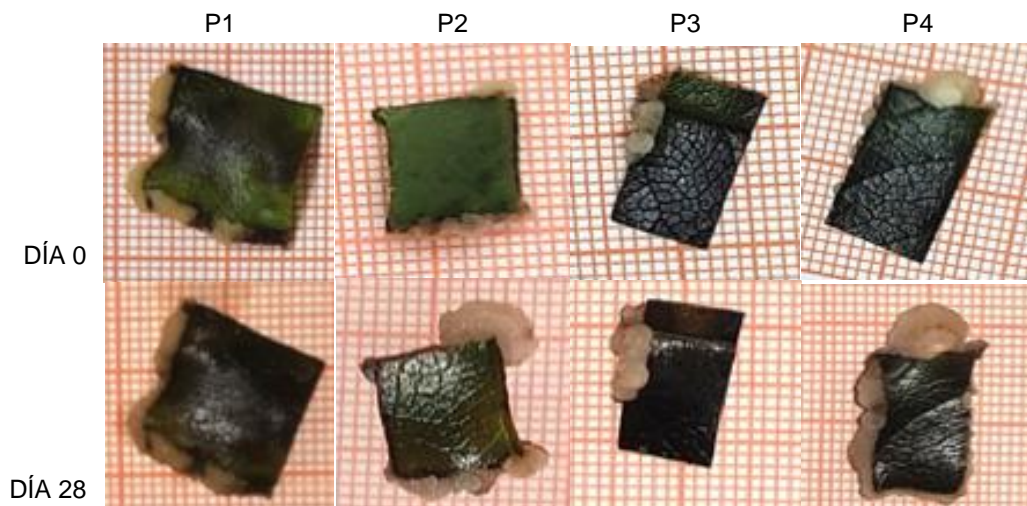
Incremento del área de callos proliferados en diferentes concentraciones de 2,4-D y BAP



Nota. Variable evaluada para cada tratamiento con diferentes concentraciones de 2,4-D y BAP (mg/L): P1(control), (b) P2 (1.5:0), P3 (0:0.1) y P4 (1.5:0.1). Medias con una letra común no son significativamente diferentes según la prueba de Kruskal Wallis ($p > 0.05$).

Figura 10

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



Nota. Explantes antes y después de la proliferación en medio MS con diferentes concentraciones de 2,4-D y BAP (mg/L): P1(control), (b) P2 (1.5:0), P3 (0:0.1) y P4 (1.5:0.1).

Capítulo V: Discusión

En el presente proyecto se desarrolló un protocolo para la obtención de callo *in vitro* a partir de hojas de rosas de corte (*Rosa hybrida* L. var. CA-B19). Con esta finalidad se ejecutaron ensayos donde se evaluó la eficacia de la desinfección de hojas durante el establecimiento, el efecto de la concentración de la auxina 2,4-D en la inducción de callogénesis y el efecto de la combinación de la auxina 2,4-D y la citoquinina BAP en la proliferación de callos.

Desinfección de los explantes

Tradicionalmente, la desinfección de tejidos vegetales se realiza con soluciones de hipoclorito de sodio (NaClO), por lo tanto, representa una buena opción para la desinfección de tejidos de *Rosa* spp. (Canli, 2003; Darsini & Anitha, 2008; Khosh-Khui & Sink, 1982). Este agente desinfectante de amplio espectro es eficaz para la eliminación de virus, bacterias, hongos y micobacterias (Girotti, 2015).

En el presente estudio, la desinfección superficial realizada con el tratamiento D4, 0.2% v/v de NaClO y 25 min de inmersión, permitió obtener el menor porcentaje de contaminación de los explantes, 10.71% (Figura 2 y 3). Mientras que, el tratamiento D3, 0.1% v/v de NaClO y 25 min de inmersión, y los tratamientos D1 y D2, que utilizan 15 min de inmersión en 0.1 y 0.2% v/v de NaClO, respectivamente, fueron insuficientes para la eliminación de microorganismos de las hojas de *R. hybrida* L. var CA-B19. Según U-Kong et al. (2012), al emplear soluciones inferiores al 0.25% v/v NaClO por 15 min en la desinfección de hojas juveniles de *Jasminum* spp se presentó una alta tasa de contaminación. Un tiempo de inmersión de 15 minutos, en las concentraciones de NaClO aplicadas, no genera diferencias estadísticamente significativas en la contaminación de los explantes, es decir, que resulta insuficiente para la desinfección de hojas de *R. hybrida*.

Wegayehu et al. (2015) llegaron a la misma conclusión empleando soluciones 0.15% v/v NaClO en explantes de *Prunus persica* L. durante 10 y 15 minutos de exposición.

No obstante, el tratamiento D4 generó una alta tasa de necrosis de las hojas de *Rosa hybrida* que correspondió al 67.86% de explantes, en consecuencia, la viabilidad de los explantes fue mínima, 21.43% (Figura 2 y 3). El tratamiento que presentó el mayor porcentaje de viabilidad durante la desinfección de explantes fue el tratamiento D3, es decir, la combinación de 0.1% v/v NaClO y 25 min de inmersión. A medida que aumentan la concentración y el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio se incrementa el porcentaje de necrosis o muerte de los explantes debido al efecto fitotóxico que produce este desinfectante (Pierik, 1987). Según Canli (2003), la desinfección con 0.5 % v/v NaClO por 20 minutos es efectivo para el cultivo de hojas de *R. multiflora*. Sin embargo, en las pruebas de desinfección preliminares realizadas con 0.5 % v/v NaClO se obtuvo la necrosis del 100% los explantes de la variedad CA-B19 durante su establecimiento (datos no mostrados), debido al genotipo, la edad del explante y la susceptibilidad de las hojas a la oxidación y necrosis (Alagarsamy et al., 2018). En otro estudio, el proceso de esterilización estandarizado por Kintzios et al. (1999), donde utiliza una solución de hipoclorito de sodio al 0.15 % durante 10 min, permite una desinfección adecuada de hojas de *Rosa* spp. No obstante, esto no coincide con los resultados obtenidos, dado que, un tiempo de inmersión de 15 minutos fue insuficiente para la desinfección, como se mencionó anteriormente.

Otras investigaciones donde utilizan mayores concentraciones de NaClO y/o tiempos de exposición que los tratamientos aplicados durante la investigación, e inclusive, estudios que emplearon plantas cultivadas *in vitro* como donadoras de hojas, obtuvieron una baja tasa de contaminación durante el establecimiento *in vitro* de explantes de hoja (Canli, 2003; Kim et al., 2004). El uso de antibióticos en el medio de cultivo podrían disminuir aún más la contaminación, sin embargo, el desarrollo de los explantes puede ser afectado negativamente (Izarra et al., 2020).

Los explantes desinfectados con los tratamientos D1, D2, D3 y D4 presentaron porcentajes de oxidación superiores al 7.14%, sin diferencias estadísticamente significativas (Figura 2 y 3). El oscurecimiento de los tejidos varía entre las diferentes especies y cultivares. Algunas rosáceas, como las especies del género *Prunus* presentan una alta frecuencia de oxidación de los explantes, como resultado de los diferentes tipos de estrés a los que están sometidos los explantes durante desinfección, corte y cultivo *in vitro* (Hernández-Amasifuen et al., 2021). El incremento de las especies reactivas de oxígeno y la pérdida de la capacidad antioxidante debido a estrés oxidativo, conducen a un oscurecimiento, crecimiento reducido e incluso la necrosis celular debido a la acumulación de compuestos fenólicos en medios de cultivo y tejidos especializados generados por los cortes y heridas en los explantes (Alagarsamy et al., 2018; Zenil et al., 2014). La oxidación y necrosis pueden reducirse mediante la adición de compuestos antioxidantes al medio de cultivo como el ácido cítrico (Pati et al., 2006). En el presente estudio, se añadió este antioxidante que permitió la reducción de la oxidación y necrosis de los explantes, en comparación a los resultados obtenidos en ensayos previos (datos no mostrados).

El análisis de correlación determinó que la contaminación y la necrosis fueron factores determinantes, puesto que, redujeron significativamente la viabilidad de los explantes en los ensayos realizados (Tabla 6). La concentración de NaClO, el tiempo de aplicación y la temperatura de la solución desinfectante deben garantizar la eliminación de microorganismos que crezcan fácilmente en condiciones *in vitro* sin ocasionar la necrosis de los explantes y, por tanto, asegurar la supervivencia de los tejidos vegetales. Además, la eficacia de este procedimiento depende de varios factores, como la edad, el estado fisiológico, el genotipo y el cultivar de la planta madre, el órgano de origen del explante, así como, su tamaño y densidad también afectan la supervivencia de los explantes (Lazo-Javalera et al., 2016; Yildiz, 2012).

Inducción de callogénesis

La presencia del regulador de crecimiento 2,4-D es un factor esencial para la inducción de callo a partir de hoja de *Rosa hybrida*. Según Ikeuchi (2013), la proporción de auxina y citoquinina en el medio de cultivo determina el estado de diferenciación y desdiferenciación de los tejidos vegetales, su aplicación exógena induce callos en varias especies de plantas.

Sin embargo, los explantes cultivados en los medios suplementados con 2,4-D presentaron una oxidación superior al 46,43% tras cuatro semanas de cultivo (Figura 4). El 2,4-D genera radicales libres que provocan estrés oxidativo y peroxidación lipídica, tiene una movilidad relativamente alta en comparación con otras auxinas, por lo que se acumula rápidamente en los tejidos y provoca la oxidación y degradación de los mismos (Taghizadeh & Dastjerdi, 2020). Existen diferentes adsorbentes y antioxidantes útiles para mitigar el oscurecimiento de los tejidos y necrosis, sin embargo, pueden impedir la inducción de células indiferenciadas (Alagarsamy et al., 2018).

Los tratamientos I3 e I4 (1.0 mg/L de BAP con 3 y 4 mg/L de 2,4-D, respectivamente) generaron un porcentaje de callogénesis mayor al 50%, con un máximo del 64.29% en el tratamiento I3 (Figura 4). De acuerdo con Huan et al. (2014) y Liu et al. (2018), se puede lograr el 100 % de la tasa de inducción de callo a partir de hojas juveniles de *R. hybrida* utilizando medio MS que contiene 3.0 mg/L de 2,4-D y 1.0 mg/L de BAP. Las diferencias en la tasa de callogénesis podrían deberse a las diferencias en la formulación de sal del medio y la respuesta del cultivar utilizado a los RCV (Dube et al., 2011).

La formación de pequeñas masas de callos inició en diferentes puntos de las superficies cortadas de las hojas (Figura 5). Los callos inducidos mostraron un color blanquecino a amarillento y de consistencia compacta, esto coincide con las observaciones de Rout et al. (1991) en *Rosa hybrida* L. cv. Landora. Sin embargo, en el estudio realizado por Huan et al. (2014), se obtuvieron callos verdes y friables. Según Kuusiene &

Kandzeauskaite (2001), el color y la consistencia del callo dependen de los genotipos y del origen del explante.

La inducción de callos inició después de los 7 días de inoculación en los medios de cultivo con concentraciones de 2,4-D superiores a 2 mg/L (Figura 6). En el estudio realizado por Rout et al. (1991), se obtuvieron callos de hojas de *Rosa hybrida* L. cv. Landora después de 7-12 días de inoculación, mientras que en la investigación de Dube et al. (2011) se obtuvieron callos de *Rosa chinensis* (cv.Dutch) tras 14 días, en medio MS suplementado con 3.0 mg/L de 2,4-D y 0.5 mg/L de BAP.

Proliferación de callo

El crecimiento de callos se realiza en medios de cultivo con reguladores de crecimiento, principalmente, auxinas y citoquininas que promueven la multiplicación de las células vegetales indiferenciadas. La concentración de estos reguladores debe optimizarse para una mayor producción de biomasa (Bano et al., 2022).

En la presente etapa, la viabilidad de los callos obtenidos a partir de hojas de *Rosa hybrida* se vio afectada por la necrosis durante su proliferación, sin embargo, los porcentajes de viabilidad para cada tratamiento fueron mayores al 78% (Figura 7), con un máximo de 96.43% en los tratamientos P2 y P4. Con el incremento de subcultivos la habilidad de diferenciación del callo desciende gradualmente, el color y la morfología de los callos se deteriora continuamente hasta la necrosis del tejido (Huan et al., 2014). Además, cuando se desarrollan regiones necróticas oscuras desde los extremos cortados, cesa el crecimiento del callo y, eventualmente, el tejido se necrosa (Trione et al., 1968).

En los ensayos realizados se halló que los tratamientos P2 y P4, es decir, la combinación de 1.5 mg/L 2,4-D y BAP (0, 0.1 mg/L), respectivamente, fue determinante en el incremento de la masa fresca y del área de callos obtenidos a partir de hoja de *Rosa hybrida* (Figura 8 y 9). En consecuencia, se determinó que el tratamiento P4 generó el

mayor incremento promedio de la masa fresca, 30.69 ± 22.20 mg. Mientras que, las medias del incremento del área de callos de los tratamientos P2 y P4 no presentaron diferencias significativas, con un incremento máximo de 29.54 ± 26.01 mm². Acorde a estos resultados, se observó un crecimiento significativo de los callos únicamente en los tratamientos P2 y P4 (Figura 10). Darsini & Anitha (2008), encontraron que la concentración hormonal de 1.5 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de BAP era óptima para una rápida proliferación de callos de *Rosa hybrida* L.cv. Babylon del 90 %, concentraciones menores de 2,4-D dieron como resultado una disminución del porcentaje de callos multiplicados. Los tratamientos sin auxinas exógenas activan principalmente la señalización de citoquininas y producen un desarrollo mínimo de células callosas (Iwase et al., 2011). Mientras que, los callos crecen lentamente y se oscurecen en medios sin reguladores de crecimiento (Liu et al., 2018). Esto coincide con los resultados observados en la proliferación de callos tras cuatro semanas de cultivo.

Capítulo VI: Conclusiones

- 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 ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 1 mg/L de 6-benzilaminopurina 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 de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 0.1 mg/L de 6-benzilaminopurina 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.

Capítulo VII: Recomendaciones

- En el protocolo de desinfección se recomienda incluir en el medio ácido ascórbico como sustituto del ácido cítrico y disminuir el tiempo de inmersión en etanol al 70% a 15 s para reducir la oxidación de los explantes.
- Para la inducción de callos se sugiere implementar cloruro de calcio y nitrato de plata 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.

Bibliografía

Akhtar, G. (2009). *Micropropagation of Rosa centifolia* [University of agriculture Faisalabad].

<https://www.grin.com/document/286650>

Alagarsamy, K., Shamala, L. F., & Wei, S. (2018). Influence of media supplements on inhibition of oxidative browning and bacterial endophytes of *Camellia sinensis* var.

sinensis. *3 Biotech*, *8*(8), 356. <https://doi.org/10.1007/S13205-018-1378-9>

Almeida, M., Mendes, E., Ebling, G., Silva, L., Artioli, F., Vieira, L., Ferraz, G., Baccarin, F.,

Oliveira, P., Cordeiro, G., Oberschepl, G., & Batagin, K. (2015). Plant morphogenesis: theoretical bases. *Advances in Forestry Science*, *2*(1), 13–22.

https://www.researchgate.net/publication/275833295_Plant_morphogenesis_theoretical_bases

Álvarez, J., & Pozo, M. (2021). *Desarrollo de un protocolo para el cultivo in vitro de Rosa chinensis* [Universidad Politécnica Salesiana].

<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/19601/1/UPS-TTQ185.pdf>

Arzate, A., Bautista, M., Piña, J., Reyes, J., & Vásquez, L. (2014). *Técnicas tradicionales y biotecnológicas en el mejoramiento genético del rosal (Rosa spp.)*. UAEM, Facultad de

Ciencias. <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/21611/Técnicas>

[rosal.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/21611/Técnicas_rosal.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Bano, A. S., Khattak, A. M., Basit, A., Alam, M., Shah, S. T., Ahmad, N., Gilani, S. A. Q.,

Ullah, I., Anwar, S., & Mohamed, H. I. (2022). Callus Induction, Proliferation, Enhanced Secondary Metabolites Production and Antioxidants Activity of *Salvia moorcroftiana* L.

as Influenced by Combinations of Auxin, Cytokinin and Melatonin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *65*, 2022. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2022210200>

Bao, Y., Dharmawardhana, P., Mockler, T., & Strauss, S. (2009). Genome scale

- transcriptome analysis of shoot organogenesis in *Populus*. *BMC Plant Biology*, 9(1), 132. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-132>
- Birksen. (2018). *The rose: a history*. <https://birksen.com/blogs/news/the-history-of-roses>
- Calva, G., & Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6(11), 1–16.
<http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/art104a.htm%5CnResumen%5Cnhttp://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r102683.PDF>
- Canli, F. (2003). Effects of Dark and TDZ on Callus Formation of Rose Leaf Explants. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6(19), 1672–1674.
<https://doi.org/10.3923/PJBS.2003.1672.1674>
- Cardoso, J., Sheng, L., & Teixeira, J. (2018). Micropropagation in the Twenty-First Century. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1815, pp. 17–46). Humana Press, New York, NY.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_2
- Carrera, E. (2019). *Breve perspectiva de la situación actual de la Biotecnología en Ecuador – Enfoque Científico*. *Revista Digital Enfoque Científico*.
<https://enfoquecientifico.com/2019/05/28/breve-perspectiva-de-la-situacion-actual-de-la-biotecnologia-en-el-ecuador/>
- Chebet, D., Okeno, J., & Mathenge, P. (2003). Biotechnological approaches to improve horticultural crop production in Kenya. *Acta Horticulturae*, 625, 473–477.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.625.56>
- Darsini, D. T. P., & Anitha, J. (2008). In vitro callus induction of *Rosa hybrida* L. Cv. Babylon. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 5(2), 857–860. <http://www.biotech-asia.org/vol5no2/in-vitro-callus-induction-of-rosa-hybrida-l-cv-babylon/>
- Delgado, C. A. (2012). *Un modelo pedagógico para la enseñanza de la producción*

biotecnológica de material vegetal [Universidad Nacional de Colombia].

<http://www.bdigital.unal.edu.co/8091/>

Dube, K., Ghude, S., & Bhusari, S. (2011). In vitro callus induction studies in *Rosa chinensis* (cv.Dutch). *Asiatic Journal of Biotechnology Resources*, 2(07), 878–883.
<https://doi.org/12.2011>

Espinosa-Leal, C., Puente-Garza, C., & García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1–18.
<https://doi.org/10.1007/S00425-018-2910-1>

Esselink, G., Smulders, M., & Vosman, B. (2003). Identification of cut rose (*Rosa hybrida*) and rootstock varieties using robust sequence tagged microsatellite site markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(2), 277–286. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1122-y>

Expoflores. (2019). *Informe Anual de Exportaciones*. https://expoflores.com/wp-content/uploads/2020/04/reporte-anual_Ecuador_2019.pdf

Expoflores. (2021). *Reporte estadístico mensual*. www.expoflores.com

FAREI. (2018). *Rose propagation*. http://farei.mu/farei/wp-content/uploads/farei_doc_repository/Booklet_Rose.pdf

Fredenburgh, J. (2020). *Cómo la pandemia de Covid-19 golpeó la cadena de las flores cortadas*. <https://www.bbc.com/future/bespoke/made-on-earth/how-the-covid-19-pandemic-hit-the-cut-flower-chain.html>

Gao, F., Peng, C., Wang, H., Shen, H., & Yang, L. (2020). Selection of culture conditions for callus induction and proliferation by somatic embryogenesis of *Pinus koraiensis*. *Journal of Forestry Research*, 32, 483–491. <https://doi.org/10.1007/s11676-020-01147-1>

- Girotti, N. (2015). *Guidelines for the use of sodium hypochlorite as a disinfectant for biological waste*. <https://www.uwo.ca/animal-research/doc/bleach-sop.pdf>
- Hernández-Amasifuen, A. D., Cortez-Lázaro, A. A., Argüelles-Curaca, A., & Díaz-Pillasca, H. B. (2021). In vitro callogenesis of peach (*Prunus persica* L.) var. Huayco rojo from leaf explants. *Ciencia Tecnología Agropecuaria*, 23(1), e2032. https://doi.org/10.21930/rcta.vol23_num1_art:2032
- Hill, G. (1967). Morphogenesis of shoot primordia in cultured stem tissue of a garden rose. *Nature*, 216(5115), 596–597. <https://doi.org/10.1038/216596a0>
- Horn, W. (1992). Micropropagation of rose (*Rosa* L.). In *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 20, High-Tech and Micropropagation IV* (pp. 320–342).
- Huan, F., Shuli, Y., Jiaheng, X., Mengqi, L., & Xuan, H. (2014). Callus Induction and Plant Regeneration of *Rosa hybrida*. *Chinese Bulletin of Botany*, 49(5), 595. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1259.2014.00595>
- Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. *Recent Advances in Plant in Vitro Culture*. <https://doi.org/10.5772/50568>
- Iannotti, M. (2020). 10 Common Rose Problems (and How to Fix Them). *The Spruce*. <https://www.thespruce.com/whats-wrong-with-my-roses-1402961>
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *The Plant Cell*, 25(9), 3159–3173. <https://doi.org/10.1105/TPC.113.116053>
- INEC. (2021). *Boletín Técnico. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua*. www.ecuadorencifras.gob.ec
- ITC. (2011). *Floricultura*. <https://www.intracen.org/itc/sectors/floriculture/>

- 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
- Iwase, A., Mitsuda, N., Koyama, T., Hiratsu, K., Kojima, M., Arai, T., Inoue, Y., Seki, M., Sakakibara, H., Sugimoto, K., & Ohme-Takagi, M. (2011). The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in arabidopsis. *Current Biology*, 21(6), 508–514. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2011.02.020/ATTACHMENT/4669ACA2-A9CD-4FAF-B2CD-EF7B5243789E/MMC2.XLS>
- Izarra, M. L., Panta, A. L., Maza, C. R., Zea, B. C., Cruzado, J., Gutarra, L. R., Rivera, C. R., Ellis, D., & Kreuze, J. F. (2020). Identification and Control of Latent Bacteria in *in vitro* Cultures of Sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam]. *Frontiers in Plant Science*, 11, 903. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00903/BIBTEX>
- Jarquín, I., Rodríguez, J., Lagunes, A., Llanderal, C., Pinto, V., Nava, C., & Silva, G. (2014). Use of cytokinins and floral protectors to enhance the quality of cut-rose flower buds. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, 20(3), 297–305.
<https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2013.05.020>
- Jiménez, E. (1998). Generalidades del cultivo *in vitro*. In *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología* (pp. 13–55). Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- Kane, M. (1991). Rose flowers: The tissue culture approach. *The American Rose Magazine*.
- Khan, I., & Shaw, J. (1988). Biotechnology in Agriculture. *Punjab Agricultural Research Coordination Board*, 1, 2.
- Kharde, A., & Kshirsagar, A. (2014). Effect of BAP and kinetin on nodal culture of *Rosa hybrida* L. *Bionano Frontier*, 7(2), 254–257.
https://www.researchgate.net/publication/330185591_EFFECT_OF_BAP_AND_KINETI

N_ON_NODAL_CULTURE_OF_ROSA_HYBRIDA_L

- Khosh-Khui, M., & Sink, K. C. (1982). Callus induction and culture of Rosa. *Scientia Horticulturae*, 17(4), 361–370. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(82\)90117-0](https://doi.org/10.1016/0304-4238(82)90117-0)
- Kim, C. K., Oh, J. Y., Chung, J. D., Burrell, A. M., & Byrne, D. H. (2004). Somatic embryogenesis and plant regeneration from in-vitro-grown leaf explants of rose. *HortScience*, 39(6), 1378–1380. <https://doi.org/10.21273/hortsci.39.6.1378>
- Kuusiene, S., & Kandzeauskaite, M. (2001). The influence of genotype and explant for callus induction and proliferation of *Rosa floribunda*. *Acta Horticulturae*, 560, 501–504. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2001.560.101>
- Lazo-Javalera, M. F., Troncoso-Rojas, R., Tiznado-Hernández, M. E., Martínez-Tellez, M. A., Vargas-Arispuro, I., Islas-Osuna, M. A., & Rivera-Domínguez, M. (2016). Surface disinfection procedure and in vitro regeneration of grapevine (*Vitis vinifera* L.) axillary buds. *SpringerPlus*, 5(1), 453. <https://doi.org/10.1186/S40064-016-2081-0>
- Liu, J., Feng, H., Ma, Y., Zhang, L., Han, H., & Huang, X. (2018). Effects of different plant hormones on callus induction and plant regeneration of miniature roses (*Rosa hybrida* L.). *Horticulture International Journal*, 2(4), 201–206. <https://doi.org/10.15406/hij.2018.02.00053>
- Marriot, M. (2003). History of roses in cultivation/modern (Post-1800). In *Encyclopedia of rose science* (pp. 402–409). Oxford: Elsevier.
- Monder, M. J., & Pacholczak, A. (2020). Rhizogenesis and concentration of carbohydrates in cuttings harvested at different phenological stages of once-blooming rose shrubs and treated with rooting stimulants. *Biological Agriculture and Horticulture*, 36(1), 53–70. <https://doi.org/10.1080/01448765.2019.1685407>
- Monthony, A., Page, S., Hesami, M., & Jones, A. (2021). The past, present and future of

cannabis sativa tissue culture. In *Plants* (Vol. 10, Issue 1, pp. 1–29). MDPI AG.

<https://doi.org/10.3390/plants10010185>

Morán, J. (2018). *Análisis de la producción de flores y exportaciones hacia los países bajos.*

Periodo 2012 - 2016 [Universidad de Guayaquil].

<http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/40697>

Murashige, T. (1974). Plant Propagation Through Tissue Cultures. *Annual Review of Plant*

Physiology, 25(1), 135–166. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.25.060174.001031>

Nizamani, F., Nizamani, G., Nizamani, M., Ahmed, S., & Ahmed, A. (2016). Propagation of

Rose (*Rosa Hybrida* L.) Under Tissue Culture Technique. *International Journal of*

Biology Research, 1(1), 23–27.

https://www.researchgate.net/publication/297714965_Propagation_of_Rose_Rosa_Hybrida_L_Under_Tissue_Culture_Technique

Nobecourt, P., & Kofler, L. (1945). Bouturage de bourgeons de rosier en milieu nutritif

aseptique. *Bulletin de La Societe Botanique de France*, 92(4–6), 78–81.

<https://doi.org/10.1080/00378941.1945.10834407>

Nybom, H., Werlemark, G., Esselink, D., & Vosman, B. (2005). Sexual preferences linked to

rose taxonomy and cytology. *Acta Horticulturae*, 690, 21–28.

<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.690.1>

Pati, P., Rath, S., Sharma, M., Sood, A., & Ahuja, P. (2006). *In vitro* propagation of rose - A

review. *Biotechnology Advances*, 24(1), 94–114.

<https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2005.07.001>

Perea, M. (2009). Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro*. In *Universidad Nacional de Colombia*

(Vol. 9, Issue 19). Universidad Nacional de Colombia.

http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad_de_Ciencias/Publicaciones/Imag

enes/Portadas_Libros/Biologia/Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_In_Vitro/Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_In_Vitro.pdf?fbclid=IwAR2xLhdtU-7yKztpAvuWQjdZYh-ltzpcYT6PnzpAErkw__Zozfqc

- Pérez-Álvarez, S., Leyva, N., Magallanes, M., Arce, A., & Méndez, A. (2016). *Hongos contaminantes en el establecimiento in vitro de ápices de papa*.
https://pdfs.semanticscholar.org/77d0/4d2a20b9d1f4cf02be75ad6e6f52efcf6270.pdf?_ga=2.204180503.686545357.1599493698-242856668.1599493698
- Pierik, R. (1987). *In vitro culture of higher plants. Handbook*. Martinus Nijhoff.
- Pooley, J. (2013). El secreto comercial: el otro derecho de propiedad intelectual. *OMPI*.
https://www.wipo.int/wipo_magazine/es/2013/03/article_0001.html
- Prakash, J. (2020). Plant Growth Regulators and their Mode of Action. *Agriculture & Food: E-Newsletter*, 2(7), 111–112.
https://www.researchgate.net/publication/342522577_Plant_Growth_Regulators_and_their_Mode_of_Action
- Reynolds, T. L. (1989). Ethylene effects on pollen callus formation and organogenesis in anther cultures of *Solanum carolinense* L. *Plant Science*, 61(1), 131–136.
[https://doi.org/10.1016/0168-9452\(89\)90127-1](https://doi.org/10.1016/0168-9452(89)90127-1)
- Roy, P., Mamun, A., & Ahmed, G. (2004). *In vitro* plantlets regeneration of rose. *Plant Tissue Culture*, 14(2), 149–154.
- Samiei, L., Davoudi, M., Tehranifar, A., & Karimian, Z. (2021). Organic and inorganic elicitors enhance *in vitro* regeneration of *Rosa canina*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00166-7>
- Shabbir, A., Hameed, N., Ali, A., & Bajwa, R. (2009). Effect of different cultural conditions on micropropagation of rose (*Rosa Indica* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 41(6), 2877–

2882.

https://www.researchgate.net/publication/216321521_Effect_of_different_cultural_conditions_on_Micropropagation_of_Rose_Rosa_indica_L

Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. In *Plantas de probeta*. Editorial de la Universidad de La Plata.

Shukla, M. (2022). The Applicability of Plant Tissue Culture in Propagation and Conservation—Series II. *Agronomy*.

https://www.mdpi.com/journal/agronomy/special_issues/Plant_Tissue

Solano, G. (2020). Ecuador's blooming flower industry feels pandemic's punch. *ABC News*.

<https://abcnews.go.com/International/wireStory/ecuadors-blooming-flower-industry-feels-pandemics-punch-72681696>

Taghizadeh, M., & Dastjerdi, M. G. (2020). Inhibition of browning problem during the callogenesis of *Spartium junceum* L. *Ornamental Horticulture*, 27(1), 68–77.

<https://doi.org/10.1590/2447-536X.V27I1.2230>

Tang, Y., Zhang, K., Zhang, Y., & Tao, J. (2019). Dormancy-Breaking and Germination Requirements for Seeds of *Sorbus alnifolia* (Siebold & Zucc.) K.Koch (Rosaceae), a Mesic Forest Tree with High Ornamental Potential. *Forests* 2019, Vol. 10, Page 319, 10(4), 319. <https://doi.org/10.3390/F10040319>

Trione, E. J., Jones, L. E., & Metzger, R. J. (1968). *In vitro* culture of somatic wheat callus tissue. *American Journal of Botany*, 55(5), 529–531. <https://doi.org/10.1002/J.1537-2197.1968.TB07408.X>

U-Kong, W., Wongsawad, P., & Buddharak, P. (2012). Shoot bud and young leaf induction of *Jasminum spp.* in *in vitro* culture. *International Journal of Applied Agricultural Research*, 7(1), 17–26. <http://www.ripublication.com/ijaar.htm>

- Valles, M., & Boxus, P. (1987). Regeneration from rosa callus. *Acta Horticulturae*, 1(212), 691–696. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1987.212.118>
- Villa, R., & Arbeláez, L. (2019). Micropropagacion in vitro de rosa *Rosa* sp. a partir de yemas axilares y respuesta callogénica. *Revista de La Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 1(31), 10–17. <https://revistaaccb.org/r/index.php/accb/article/view/176>
- Vukosavljev, M., Zhang, J., Esselink, G., van 't Westende, W., Cox, P., Visser, R., Arens, P., & Smulders, M. (2013). Genetic diversity and differentiation in roses: A garden rose perspective. *Scientia Horticulturae*, 162, 320–332. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.08.015>
- Wang, G., Yuan, M., & Hong, Y. (2002). *In vitro* flower induction in roses. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 38(5), 513–518. <https://doi.org/10.1079/IVP2002340>
- Wegayehu, F., Firew, M., & Belayneh, A. (2015). Optimization of explants surface sterilization condition for field grown peach (*Prunus persica* L. Batsch. Cv. Garnem) intended for *in vitro* culture. *African Journal of Biotechnology*, 14(8), 657–660. <https://doi.org/10.5897/AJB2014.14266>
- Weyler, E., & Kusery, W. (2001). Propagation of roses from cuttings. *Horticultural Science*, 15(1), 85–86.
- Windham, M. (2019). Rose Diseases : Identification and Management. *Institute of Agriculture. The University of Tennessee*, 1–8. <https://extension.tennessee.edu/publications/Documents/W833.pdf>
- Yildiz, M. (2012). The Prerequisite of the Success in Plant Tissue Culture: High Frequency Shoot Regeneration. In *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. IntechOpen.

<https://doi.org/10.5772/51097>

Yong, A. (2004). El cultivo del rosal y su propagación. *Cultivos Tropicales*, 25(2), 53–60.

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193217832008>

Zenil, N., Colinas, M., Bautista, C., Vázquez, T., Lozoya, H., & Martínez, M. (2014). Fenoles totales y capacidad antioxidante estimada con los ensayos DPPH/ABTS en rosas en soluciones preservantes. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(6), 1029–1039.

<https://doi.org/10.29312/remexca.v5i6.887>

Apéndices