

ESCUELA POLITECNICA DEL EJÉRCITO – ESPE

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS – I.A.S.A.
GRAL. CARLO MAGNO ANDRADE PAREDES**

**REGENERACIÓN DE BROTES A PARTIR DE HOJAS
PROVENIENTES DE PLANTAS *IN VITRO* DE ROSA,
VARIEDAD AKITO (*Rosa* sp. Var Akito)**

Previa a la obtención de Grado Académico o título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

SANDRA PAULINA NARVÁEZ GARZÓN

Sangolquí, 4 de febrero de 2009

I.A.S.A.

**REGENERACIÓN DE BROTES A PARTIR DE HOJAS PROVENIENTES
DE PLANTAS *IN VITRO* DE ROSA, VARIEDAD AKITO (*Rosa* sp. Var Akito)**

2009

CERTIFICACIÓN

Dr. Darwin Rueda

Ing. Pablo Landázuri

Certifican:

Que el trabajo titulado REGENERACIÓN DE BROTES A PARTIR DE HOJAS PROVENIENTES DE PLANTAS *IN VITRO* DE ROSA, VARIEDAD AKITO (*Rosa* sp. Var Akito), realizado por Sandra Paulina Narváez Garzón, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a los resultados innovadores para la obtención de brotes de esta especie, SI recomiendan su publicación.

El mencionado trabajo consta de dos documentos empastados y cinco discos compactos los cuales contienen los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a Sandra Narváez que lo entregue a Ing. Patricia Falconí, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

El Prado, 4 de febrero de 2009

Dr. Darwin Rueda**DIRECTOR**

Ing. Pablo Landázuri**CODIRECTOR**

DECLARACION DE RESPONSABILIDAD

Sandra Paulina Narváez Garzón

Declaro que:

El proyecto de grado denominado REGENERACIÓN DE BROTES A PARTIR DE HOJAS PROVENIENTES DE PLANTAS *IN VITRO* DE ROSA, VARIEDAD AKITO (*Rosa* sp. Var Akito), ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

El Prado, 4 de febrero de 2009

SANDRA PAULINA NARVÁEZ GARZÓN

AUTORIZACIÓN

Yo, Sandra Paulina Narváez Garzón

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo REGENERACIÓN DE BROTES A PARTIR DE HOJAS PROVENIENTES DE PLANTAS *IN VITRO* DE ROSA, VARIEDAD AKITO (*Rosa* sp. Var Akito), cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

El Prado, 4 de febrero de 2009

SANDRA PAULINA NARVÁEZ GARZÓN

REGENERACIÓN DE BROTES A PARTIR DE HOJAS PROVENIENTES DE
PLANTAS *IN VITRO* DE ROSA, VARIEDAD AKITO (*Rosa* sp. Var Akito)

SANDRA PAULINA NARVÁEZ GARZÓN

Aprobado por los señores miembros del tribunal de calificación del informe
técnico.

	CALIFICACIÓN	FECHA
DIRECTOR		
Dr. Darwin Rueda
CODIRECTOR		
Ing. Pablo Landázuri

Certifico que estas calificaciones fueron presentadas en esta secretaría.

Abg. Carlos Orozco

Delegado de la Unidad de Admisiones y Registros – IASA I

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO.....	3
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. GENERALIDADES.....	4
2.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	4
2.2.1. Características Taxonómicas y morfológicas.....	4
2.3. SISTEMAS DE PROPAGACIÓN.....	5
2.3.1. Propagación por semilla.....	6
2.3.2. Propagación por estacas.....	6
2.3.3. Propagación por injerto.....	6
2.3.3.1. El injerto de varetta o injerto inglés.....	6
2.3.3.2. Injerto de yema.....	7
2.3.4. Micropropagación.....	7
2.4. MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS SUPERIORES.....	8
2.4.1. Propagación vegetativa in vitro.....	8
2.4.2. Factores que influyen en el cultivo in vitro.....	9
2.5. REGENERACIÓN Y MORFOGÉNESIS.....	10
2.5.1. Generalidades.....	10
2.5.2. Tipos de morfogénesis.....	11
2.6. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	12
2.6.1. Etapas de la embriogénesis somática.....	12
2.6.2. Factores que afectan a la embriogénesis somática.....	12
2.6.2.1. Explante.....	12
2.6.2.2. Reguladores de crecimiento.....	13
2.6.2.3. Medio de cultivo.....	15
2.6.3. Ventajas y desventajas de la embriogénesis somática.....	15
2.7. ORGANOGÉNESIS.....	15
2.7.1. Fases de la regeneración u organogénesis.....	17
2.7.2. Factores que afectan la organogénesis.....	18
2.7.2.1. Explante.....	18
2.7.2.2. Medio de cultivo.....	19
2.7.2.3. Reguladores de crecimiento.....	19
2.7.2.4. Otros factores.....	20
2.7.3. Ventajas de la organogénesis.....	20
2.7.4. Multiplicación masiva de vegetales mediante la organogénesis.....	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN.....	22

3.2. MATERIALES.....	22
3.2.1. Materiales y Equipos.....	22
3.2.2. Reactivos.....	22
3.2.2.1 Sales minerales.....	22
3.2.2.2 Sustancias orgánicas.....	23
3.2.2.3 Hormonas.....	23
3.2.2.4 Otros materiales.....	23
3.3. MÉTODOS.....	24
3.3.1. Obtención del material vegetal.....	24
3.3.2. Poda de plantas.....	25
3.3.3. Fase de regeneración <i>in vitro</i>.....	25
3.3.3.1. Medio de inducción.....	25
3.3.3.2. Medio de regeneración.....	29
3.3.4. Pruebas de histología.....	30
3.3.4.1. Fijación y deshidratación.....	30
3.3.4.2. Inclusión en cera de parafina.....	30
3.3.4.3. Cortes de los bloques.....	31
3.3.4.4. Desparafinización de los cortes.....	32
3.3.5. Proliferación de brotes.....	32
IV. RESULTADOS.....	35
4.1. Composición del medio de regeneración más adecuado y del tiempo de exposición de los explantes.....	35
4.2. Medio de inducción y medio de regeneración.....	39
4.2.1. Medio de inducción.....	39
4.2.2. Medio de regeneración.....	40
4.3. PRUEBAS DE HISTOLOGÍA.....	41
4.4. PROLIFERACIÓN DE BROTES.....	42
4.5. FENOLIZACIÓN.....	44
V. DISCUSIÓN.....	46
VI. CONCLUSIONES.....	50
VII. RECOMENDACIONES.....	52
VIII. RESUMEN.....	53
IX. SUMMARY.....	54
X. BIBLIOGRAFÍA.....	55
XI. ANEXOS.....	59

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 3.3.3.1.1. Dosis de TDZ y ANA para la inducción de brotes, IASA I, Ecuador, 2008.....	26
Cuadro 3.3.5.1. Dosis de BA para la proliferación de yemas brotadas, IASA I, Ecuador, 2008.....	33
Cuadro 4.1.1. Análisis de la varianza para el número de brotes formados bajo la influencia de la exposición de hojas en el medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2008.....	35
Cuadro 4.1.2. Promedio (\pm) del error estándar del número de brotes formados bajo diferentes tiempos de exposición en el medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2008.....	36
Cuadro 4.1.3. Promedio (\pm) del error estándar del número de brotes formados bajo diferentes tratamientos, IASA I, Ecuador, 2008.....	37
Cuadro 4.1.4 Promedio (\pm) del error estándar del número de brotes formados bajo el efecto de las diferentes dosis de ANA, IASA I, Ecuador, 2008.....	38
Cuadro 4.1.5. Promedio (\pm) del error estándar del número de brotes formados bajo el efecto de las diferentes dosis de TDZ, IASA I, Ecuador, 2008.....	39

LISTADO DE GRÁFICOS

Figura 4.1.3. a) Explantes expuestos a los diferentes tratamientos en medio de inducción, b) Brotes regenerados en T1, ensayo 3 c) Brotes regenerados en T8, ensayo 4, IASA I, Ecuador, 2008.....	38
Figura 4.2.1.1. Número de brotes formados en el medio de inducción en los diferentes ensayos, IASA I, Ecuador, 2008.....	40
Figura 4.2.1.2. Brotes regenerados en el medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2008.....	40
Figura 4.2.2.1. Número de brotes formados en el medio de regeneración en los diferentes ensayos, IASA I, Ecuador, 2008.....	41
Figura 4.2.2.2. Brotes regenerados en el medio de regeneración, IASA I, Ecuador, 2008.....	41
Figura 4.3.1. Corte histológico de un brote de rosa, IASA I, Ecuador, 2008.....	42
Figura 4.4.1. Relación entre el número de brotes formados bajo el efecto de las diferentes dosis de BA, IASA I, Ecuador, 2008.....	43
Figura 4.4.2. Brotes en medio de proliferación a) Brote con dosis 0,75 mgxl⁻¹ BA, b) Brote con dosis 1,126 mgxl⁻¹ BA, c) Brote con dosis 2 mgxl⁻¹ BA, d) Brote con dosis 0 mgxl⁻¹ BA, IASA I, Ecuador, 2008.....	43
Figura 4.5.1. Número de brotes fenolizados en el medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2008.....	44
Figura 4.5.2. Número de brotes fenolizados en el medio de regeneración, IASA I, Ecuador, 2008.....	45
Figura 4.5.3. Brotes fenolizados, IASA I, Ecuador, 2008.....	45

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo.....59

Anexo 2. Esquema del protocolo de regeneración directa de hojas de rosa, variedad Akito.....60

Anexo 3. Esquema de brotación de los explantes (hojas).....61

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, las rosas ecuatorianas vendidas al exterior han aumentado significativamente llegando en el 2005 a un crecimiento de 56.61% en toneladas, estimándose que para la actualidad se tenga un incremento de al menos un 35% más en la extensión de este cultivo en el país (Expoflores 2006).

El Ecuador registra problemas de productividad, en parte, esto se ha visto afectado por el uso de sistemas de propagación tradicionales como la injertación. Las desventajas de este sistema son: el prolongado período para el desarrollo completo de la flor para asegurar que el brote productor de flores sea del tipo verdadero (tres años aproximadamente), los problemas fitosanitarios que afectan al desarrollo de la planta (Infoagro, 2007), la disminución de plantas y por lo tanto pocas rosas para la comercialización, el número de injertos homogéneos que se pueden obtener de cada planta madre es reducido, multiplicando se obtiene un número limitado de plantas; mientras que por el método de cultivo de tejidos *in vitro*, se obtendría el doble de plantas (400.000 plantas por año) y mucho más por el sistema de organogénesis, ya que se obtendrían un gran número de nuevos brotes a partir de cantidades mínimas de tejido (Pati *et al.*, 2004)

La regeneración directa en brotes, fue reportado por primera vez usando hojas y explantes de raíces en las siguientes variedades de Rosa: Persica, Laevigata y Wichuriana (Lloyd *et al.*, 1998).

Uno de los primeros en realizar exitosamente la regeneración directa de brotes en rosas ornamentales (*Rosa hybrida*), fueron Leffering y Kok en 1990, a partir de explantes de hojas *in vitro*. Mientras que en la India en el 2004, también pudieron realizar la regeneración directa a partir de explantes foliares en rosa de la variedad Damascena mill, los cuales llegaron hasta la fase de invernadero (Pati *et al.*, 2004).

Por la necesidad de implementar un método eficaz de propagación de rosa, en esta investigación se buscó desarrollar una técnica óptima en regeneración vegetativa *in vitro* en rosa de la variedad *Akito* a partir de explantes foliares a través de la organogénesis; este proceso ofreció altas tasas de multiplicación en un tiempo corto y la obtención de cultivos sanos, libres de virus y agentes patógenos, así como una rápida reproducción y crecimiento de brotes y raíces en forma sucesiva, uniformidad en el cultivo, disponibilidad del material vegetal a lo largo de todo el año, ayudando de esta manera al desarrollo y competitividad en el sector florícola nacional, y también como base para futuras investigaciones en esta área.

1.1. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

Regenerar brotes a partir de hojas provenientes de plantas *in vitro* de rosa, variedad Akito, en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Agropecuarias IASA I.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la dosis óptima de Thidiazuron (TDZ) y ácido naftalenacético (ANA), para la formación de brotes directo o indirecto a partir de hojas (con y sin yemas), en el medio de inducción.
- Realizar análisis histológicos de los brotes obtenidos para determinar si es organogénesis directa o indirecta.
- Evaluar los efectos de las distintas dosis del benciladenina (BA) en la fase de proliferación de brotes.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. GENERALIDADES

Se dice que la rosa es originaria de Asia Central, a partir de ese origen la llevan al Este para América del Norte y hacia el Oeste de Asia y Europa, no pasando nunca la línea ecuatorial. Se han logrado conservar manuscritos chinos, que datan alrededor de 5000 años antes de la cristiandad, donde se hace referencia a jardines de rosas. En América fueron cultivadas por los Incas, que la llamaron “arbusto del sol” (Sticconi, 2003).

Estudios realizados acerca de la producción de rosa, indican que las rosas están entre las primeras plantas en ser domesticadas y entre las más apetecidas. Aunque hay cerca de 200 especies de Rosa, se conoce que solo 11 contribuyeron al origen de los cultivares modernos *R. canina* L., *R. chinensis*, *R. foetida* Herm., *R. gallica* L., *R. gigantea* Colett ex Crép., *R. moschata* Herm., *R. multiflora* Thunb. Ex

Murr., *R. Phoenicea* Boiss., *R. rugosa* Thunb., *R. wichwaiana* Crép., y *R. rubra* Black (Gudin, 1998).

2.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

2.2.1. Características Taxonómicas y Morfológicas

La rosa pertenece a la familia *Rosaceae*, su nombre científico es *Rosa* sp. La mayor parte de las rosas cultivadas se encuentran en zonas templadas del hemisferio norte y se conoce que su centro de origen se encuentra en Asia, su número exacto de especies es aún desconocido. (Rout *et al*, 1999).

Las variedades que más se utilizan son los tipos denominados híbridos de té y en menor medida los de floribunda. (Infoagro, 2007). Los primeros son resultado de la cruce entre *Rosa gigantea* y *Rosa chinensis*, generalmente son muy perfumadas, de porte erecto, poco ramificados, flores grandes y altas en el centro, o con flores simples o en racimos, alcanzan de 0,60 a 1,30 m de altura.

Los rosales floribunda, son de flores más pequeñas que los anteriores, tienen flores simples, semidobles o dobles agrupadas en racimos y florecen continuamente hasta las primeras heladas. (Serra, 2006)

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Rosales

Familia: Rosaceae

Género: Rosa

2.3. SISTEMAS DE PROPAGACIÓN

La propagación se puede llevar a cabo por semillas, estacas, injertos de varetas e injertos de yema y por micropropagación.

2.3.1. Propagación por Semilla

La propagación por semillas sólo se hace para producir nuevas variedades y no es un proceso aplicable a gran escala, ya que las plantas así obtenidas varían grandemente en sus características genéticas.

2.3.2. Propagación por Estacas

Se seleccionan a partir de vástagos florales a los que se les ha permitido el desarrollo completo de la flor para asegurar que el brote productor de flores es del tipo verdadero. Además, los brotes sin flor son menos vigorosos, por lo que poseen menos reservas para el enraizamiento. Pueden utilizarse estacas con una, dos o tres

yemas, dependiendo de la disponibilidad de material vegetal, aunque son preferibles las de tres yemas, ya que presentan mayor longitud y más tejido nodal en la base, disminuyendo así las pérdidas debidas a enfermedades

2.3.3. Propagación por Injerto

2.3.3.1. El injerto de vareta o injerto inglés

Este tipo de injerto, rara vez se utiliza para la producción comercial de flor de corte, ya que también requiere demasiado tiempo.

2.3.3.2. Injerto de yema

En este injerto, el patrón más común es *Rosa manetti*, *Natal briar* y, ocasionalmente *R. odorata*. En Nueva Zelanda se emplea *R. multiflora* inermis y en zonas más frías como Holanda, *R. canina*. Se practica una incisión en forma de "T" hasta la profundidad del cambium, bajo los brotes del patrón. Se inserta entre las solapas que forman la "T" la yema procedente del brote de un cultivar elegido, procurando un sistema de sujeción por encima y por debajo de la yema.

En Holanda se emplea una técnica alternativa conocida como "stenting", que consiste en injertar lateralmente el cultivar deseado sobre una estaquilla del portainjertos que se enraíza mediante los métodos normales de propagación. (Infoagro, 2007).

2.3.4. Micropropagación

La micropropagación consiste en producir plantas en laboratorio en condiciones controladas. Se inicia con el cultivo de tejidos *in vitro*, para el cual, el material vegetal que se utiliza puede ser una célula, tejido u órgano de la planta. Estos pueden proceder de tejidos somáticos como: tallo, raíz, hoja, meristemos, embriones, etc.; o de tejidos no somáticos como: anteras, polen, microesporas, óvulos, etc. (Medina, 2005).

Una vez que se han formado brotes, se realiza la multiplicación de los mismos, después pasan por una fase de enraizamiento y finalmente por una fase de aclimatización.

2.4. MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS SUPERIORES

Según Roca (1993), El cultivo de tejidos *in vitro* para plantas superiores tiene importantes ventajas frente a otros sistemas convencionales de propagación: tiene un incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo, una reducción del tiempo de multiplicación, la posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida a bajos costos y en tiempos económicamente costeables, mayor control sobre la sanidad del material que se propaga, facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro con menos restricciones aduaneras, y la posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual solo existan pocos individuos; etc.

2.4.1. Propagación Vegetativa *In Vitro*

En 1838, Schwann y Schleiden, lanzaron la teoría denominada la totipotencia, la cual establece que las células son autosuficientes y que en principio son capaces de regenerar una planta completa. Su teoría fue de hecho el núcleo del que nació el cultivo de tejidos y células. Luego en 1901, Morgan generó el término de la totipotencialidad celular, que dice que una célula es capaz de desarrollarse hasta formar un organismo completo si las condiciones ambientales le son favorables y si se le aplican los estímulos adecuados (Smith, 2000).

El descubrimiento de las hormonas vegetales, citoquininas, en 1956 fue el primer paso para desarrollar el cultivo *in vitro*. Luego se completó con una serie de logros que culminaron en 1962 con la obtención de la solución mineral conocida

como Murashige y Skoog (MS), haciendo realidad la obtención de vitroplantas (Smith, 2000).

Con el término *in vitro* se hace referencia al medio de cultivo artificial y estéril en el que se desarrollan este tipo de técnicas. Son diversos los procedimientos que se aplican y van desde el cultivo de células hasta el de órganos completos como raíces. Estas técnicas se han utilizado para sanear material mediante el cultivo de meristemos libres de virus, obtención de plantas haploides, micropropagación a partir de yemas preformadas, ganando tiempo y espacio, y eliminando factores ambientales adversos del cultivo *ex vitro*, etc (Mansouri et. al, 2006).

Merecen especial énfasis los sistemas de regeneración a los que se consideran la piedra angular del cultivo de tejidos vegetales. Existen tres aproximaciones para regenerar plantas completas *in vitro*: el cultivo de embriones, la embriogénesis somática o asexual y la organogénesis (Mansouri et. al, 2006).

2.4.2. Factores que Influyen en el Cultivo *In vitro*

El crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por una serie de factores complejos como la constitución genética de la planta, factor decisivo en todos los momentos de la vida de la planta, determina si la planta es monocotiledónea o dicotiledónea, qué forma van a tener las hojas, qué temperatura

es óptima para el crecimiento y la floración, la forma y el color de las flores; los nutrientes, en donde encontramos el agua, macro y micro-elementos y azúcares, estos son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta; factores físicos, que influyen sobre el crecimiento como son la luz, temperatura, pH, concentraciones de O₂ y CO₂; y algunas sustancias orgánicas como los reguladores (auxinas y citokininas, regulan el desarrollo de los órganos *in vitro*), vitaminas (inositol, vitamina B, ácido fólico, ácido pantoténico), agar (derivado de un alga marina y agente gelificante para los medios), minerales y aminoácidos como fuente de nitrógeno, carbón activado. (Pierik, 1979 citado por Roca, 1993).

2.5. REGENERACIÓN Y MORFOGÉNESIS

2.5.1. Generalidades

Las células y los tejidos están “determinados” para rutas morfogenéticas y metabólicas específicas, de modo que, por un proceso ordenado y predecible, forman órganos y regeneran plantas. La determinación depende, lógicamente, de la propia naturaleza del tejido, de su estado vegetativo y del tratamiento que ha recibido, produciéndose, a veces, nuevos fenotipos que perduran en ausencia de los factores causantes del cambio. Existe una serie de especies que, en estado silvestre, son capaces de regenerar a partir de pequeños fragmentos de tejidos cortados (Hurtado, 1998).

Otro modelo de determinación estable es el cambio de los tallos de los espermatófitos (plantas con semilla) de crecimiento vegetativo a reproductivo, inducido por un estímulo lumínico recibido por las hojas y transmitido al meristemo del tallo (Hurtado, 1998).

El potencial de desarrollo del tejido cambia y se reduce a medida que procede el estado de determinación. Sin embargo estos cambios no siempre son irreversibles, hay varios tipos de células y órganos, altamente determinados y que son totipotentes si reciben un estímulo adecuado. Además cada célula posee en su material genético, toda la información necesaria para especificar cualquier rasgo morfológico, químico y/o funcional de la célula, el tejido y la planta, durante su ciclo vital. Estas células expuestas a ciertas condiciones, se desarrollan tipos de organogénesis que excluyen a otros, variando las células cultivadas en su competencia para la morfogénesis y la sensibilidad a inductores (Hurtado, 1998).

2.5.2. Tipos de Morfogénesis

La regeneración, es la reconstrucción del tejido a partir de una o varias células. La morfogénesis comprende como el desarrollo de las formas y estructuras de un organismo o de parte de un organismo (Hurtado, 1998).

La embriogénesis somática y la organogénesis son dos procesos morfogénesis muy frecuentes en el cultivo *in vitro* de especies vegetales. La embriogénesis somática es el proceso por el cual se obtiene una estructura similar al embrión zigótico sin que exista la fertilización de los gametos, mientras que por organogénesis pueden obtenerse tallos, raíces o flores mediante la inducción de una célula o un grupo de células que tienen la propiedad de mantenerse en activa división (Radice, 2004).

2.6. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

2.6.1. Etapas de la Embriogénesis Somática

Ocurre en dos etapas: En la primera fase, células competentes aisladas en medios ricos en auxinas forman grupos de células embriogénicas (centros embriogénicos). En la fase dos, una vez repicados los centros embriogénicos a un medio sin auxinas, estos proliferan de forma lenta e indiferenciada. Luego se producen una serie de rápidas y sucesivas divisiones celulares en distintas zonas del centro embriogénico y se conforman embriones globulares, que al crecer pasando por los estados de corazón y torpedo y tras una fase de maduración y germinación darán lugar a plantas completas (López, 2005).

2.6.2. Factores que Afectan a la Embriogénesis Somática

2.6.2.1. Explante

Todos los tejidos tienen capacidad para formar callos *in vitro*; sin embargo pocos explantes tienen la habilidad para producir callos embriogénicos. Se han usado con éxito partes de plántulos como cotiledones, hipocótilos y embriones, segmentos de tallos, hojas y raíces (Ammirato 1983, citado por Roca, 1993).

Según Pati *et al.*, (2005), en el cultivo de rosa para la inducción de embriogénesis somática, hay investigaciones en las que se han utilizado diferentes explantes como hojas en *Rosa hybrida* cvs. Domingo, Vicket Brown, Tanja, Azteca, (de Wit *et al.*, 1990), semillas inmaduras en *Rosa rugosa* (Kunitake *et al.*, 1993), peciolos en *Rosa hybrida* cvs. Glad Tidings, Trumpeter (Marcham *et al.*, 1996), segmentos de tallos en *Rosa hybrida* cv. Landora (Rout *et al.*, 1991), hasta incluso con filamentos en *Rosa hybrida* (Noriega and Sondahl, 1991).

La respuesta embriogénica del callo depende del genotipo de la planta. Algunos cultivares se pueden regenerar fácilmente en un medio específico, mientras que otros cultivares no responden en el mismo medio (Linz, 1993, citado por Roca, 1993).

El estado de desarrollo de la planta madre afecta la respuesta morfológica del explante; Bank observó que los explantes obtenidos a partir de plantas maduras de

Hedera helix formaban callos embriogénicos, mientras que ello no ocurría con explantes de plantas jóvenes (Linz, 1993, citado por Roca, 1993).

2.6.2.2. Reguladores de crecimiento

De acuerdo con Evans *et al.*, 1981, citado por Roca, 1993, la mayoría de los sistemas embriogénicos requieren, para la inducción de los embriones, de una concentración alta de auxina (generalmente 2,4-D) en el medio. El papel de las citoquininas en el medio primario o inductor del embrión es menos claro, aunque normalmente este medio incluye una de ellas. Mientras que Fujimura *et al.*, (1980) han sugerido que las citoquininas pueden ser esenciales para la maduración y la germinación de los embriones somáticos.

El ácido giberélico (AG) también se ha incorporado al medio con el fin de ayudar a la maduración normal y a la germinación de los embriones somáticos de *Panicum maximum* (Lu *et al.*, 1981), *Santalum album* (Lakshmi Sita *et al.*, 1979), entre otras (Jarret, 1993, citado por Roca, 1993).

Dohm *et al.*, 2001, realizaron una investigación en embriogénesis somática en rosa, utilizando como explantes a hojas en un medio basal MS suplementado con 2,4-D o con ANA. Subsiguiente se realizaron subcultivos en medio MS con TDZ y

finalmente los callos embriogénicos fueron propagados en un medio MS con ANA, TDZ y GA₃.

Castillón *et al* (2006), probaron varios carbohidratos en regeneración de plantas a través de la embriogénesis somática en *Rosa hybrida* cvs. Trumpeter, Dr. Huey y Tineké.

Hsia and Korban (1996), obtuvieron embriogénesis somática en investigaciones realizadas en *Rosa hybrida* cv. Carefree Beauty and *Rosa chinensis* cv. Red Sunblaze y Baby Katie utilizando medio MS suplementado con 2,4-D y ANA.

2.6.2.3. Medio de cultivo

Generalmente se ha usado el medio desarrollado por Murashige *et al.*, (1962) o la modificación de esta formulación (Evans *et al.*, 1981, citado por Roca, 1993.); la concentración alta de sales de este medio parece ser muy benéfica para el crecimiento de embriones somáticos (Ammirato, 1983).

2.6.3. Ventajas y Desventajas de la Embriogénesis Somática

La embriogénesis como sistema de propagación de plantas presenta una serie de ventajas frente a otros sistemas: Una enorme capacidad de multiplicación aplicable industrialmente, permite obtener en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz, que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente.

Presenta una serie de problemas, produciéndose anomalías morfológicas, fisiológicas y genéticas en los cultivos, fenómenos de poliembrionía indeseables, falta de maduración y dormancia o germinación prematura de los embriones en cultivo. Otra desventaja de la técnica es que no puede aplicarse a gran escala.

2.7. ORGANOGÉNESIS

Es una técnica de la biotecnología vegetal que permite la formación de tallos adventicios, yemas, y de raíces a partir de explantes directamente (hojas, tallos y flores, etc.), cultivo de callos, de meristemos o de células en suspensión. Estos órganos inducidos a partir de una célula o de un grupo de células que según la condiciones de cultivo, tienen la propiedad de mantenerse en activa división (Jarret, 1993, citado por Roca, 1993).

Se da normalmente en dos fases, la producción y crecimiento de tallos a partir de callo, hojas, cotiledones, hipocótilos, etc. y como segunda fase su posterior enraizamiento (Mansouri *et al.*, 2006).

Existen dos tipos de organogénesis *in vitro*: directa e indirecta. La forma directa son sistemas mediante los cuales a partir de la siembra *in vitro* de diferentes explantes relativamente grandes y en condiciones adecuadas, puede inducirse la formación de nuevos brotes, raíces o flores directamente de una parte de la planta, sin la formación de callo (Polci y Friedrich, 2004).

Según Pati *et al.*, (2005), se ha realizado organogénesis directa en cultivos de rosa en: *Rosa persica_x xanthiana* a partir de hojas y raíces en medio MS con BAP (Lloyd *et al.*, 1988), *Rosa hybrida* cvs. Madelon, Only Love, Presto, Sonia, Tinekel, a partir de hojas y peciolo en un medio de inducción formulado con medio MS, TDZ, ANA, caseína, Nitrato de Plata y sales hidrosolubles; y en un medio de regeneración a base de MS, BAP, NAA y FeEDDAH (Dubois and de Vries, 1995).

La forma indirecta en cambio es que a partir de la siembra de un explante *in vitro* se observa la proliferación de células en forma desordenada y sin ninguna función predeterminada, se iniciará la producción de callos o suspensiones celulares; esta diferenciación de órganos, estará condicionada a la previa formación de los meristemoides; este sistema es el más utilizado y el que más investigaciones ha tenido debido a su importancia en la micropropagación clonal (Roca, 1993).

Pati *et al.*, 2005, también indica investigaciones realizadas en rosa obteniéndose organogénesis indirecta en: Rosa hybrida cv. Melrutral a partir de hojas y raíces en medio MS suplementado con BAP y ANA (Arene *et al.*, 1993), Híbridos de té cv The Doctor a partir de segmentos de tallo en un medio preparado con 2,4-D y leche de coco (Hill, 1967).

2.7.1. Fases de la Regeneración u Organogénesis

La regeneración es un proceso que comprende diferentes fases, de acuerdo con de Klerk *et al.*, (1997) denominaron a estas diferentes fases como fase de adquisición de la competencia, fase de inducción y fase de realización (Polci y Friedrich, 2004).

En la primera fase las células no responden al estímulo organogénico pero adquieren esa competencia durante una fase de desdiferenciación. En la segunda fase llamada fase de inducción, las células son receptivas al estímulo morfogénico y hay una relación directa entre el tipo, concentración y combinación de reguladores del crecimiento agregados al medio de cultivo y el órgano a desarrollar, y por último la fase de realización, la célula sufre sucesivas divisiones para formar el órgano determinado (Polci y Friedrich, 2004).

2.7.2. Factores que Afectan la Organogénesis

Los factores que afectan la organogénesis son: los tipos de explante, el medio de cultivo, los reguladores de crecimiento, entre otros factores tanto físicos como químicos.

2.7.2.1. Explante

Virtualmente todas las partes de la planta se han utilizado como explantes para la iniciación de callo, no obstante los tejidos juveniles poseen un alto grado de actividad meristemática. Los explantes que se han utilizado exitosamente son ramas en floración, pedúnculos florales, embriones inmaduros, meristemas, epicotilos, yemas florales, partes de rizomas, caquis, bulbos, hojas de coníferas, tubérculos y raíces (Jarret, 1993, citado por Roca, 1993).

Puede haber variación en los requerimientos de los reguladores de crecimiento para la organogénesis según el tipo de tejido usado como explante, así como también el tamaño del explante, ya que los explantes grandes poseen un potencial regenerador mayor. Además el estado de la planta madre y la estación durante la cual el explante es extraído también pueden afectar notablemente el potencial organogénico (Jarret, 1993, citado por Roca, 1993).

2.7.2.2. Medio de cultivo

Los medios usados más frecuentemente para promover la organogénesis son los de Murashige *et al.*, (1962), White (1963), Gamborg *et al.*, (1968), Linsmaier *et al.*, (1965), Schenk *et al.*, (1972) y Heller (1953). Pero Murashige es el más usado para cualquier tipo de planta (Linz, 1993, citado por Roca, 1993).

La sacarosa es generalmente la fuente carbonada que se usa en los estudios de organogénesis. Este elemento puede favorecer la formación de yemas y de callos, como también cambiar la textura de los mismos (Linz, 1993, citado por Roca, 1993).

Otros tipos de compuestos que pueden afectar la organogénesis, son los fenoles sustituidos y los alcaloides. Lee *et al.*, (1965) informaron que los fenoles monohidróxidos sustituidos en las posiciones 2 o 4 estimulan la formación de yemas (Linz, 1993, citado por Roca, 1993).

2.7.2.3. Reguladores de crecimiento

Usualmente se induce la formación de callos a partir de explantes en medios que contengan una proporción alta de auxinas: citocinina. En cambio para la diferenciación de yemas se logra subcultivando los callos en un medio que tenga una alta relación citocinina: auxina. Para la diferenciación de raíces se requieren medios con una relación citocinina; auxina baja. En medios con citocinina, algunas veces ocurre la organogénesis directamente del explante. Mientras que las giberelinas también pueden tener un papel importante en la organogénesis, aunque pueden inhibir la diferenciación, y algunas veces estimulan la formación de yemas (Jarret *et al.*, 1993).

2.7.2.4. Otros factores

La organogénesis puede estar afectada por una gran variedad de factores como luz, temperatura, consistencia del medio y pH, para lo cual hay que tener en cuenta estos parámetros recomendados por Jarret (1993), como son la luz, la temperatura a 25 °C, consistencia del medio y pH; un fotoperíodo de 12 – 16 hrs (1000 a 3000 lux), tratamiento con temperaturas bajas, medios semisólidos (0.3 - 1 % de agar), la polaridad del explante, humedad relativa y que el medio tenga una fase gaseosa.

2.7.3. Ventajas de la Organogénesis

La organogénesis como sistema de propagación de plantas presenta una serie de ventajas frente a otros sistemas (López, 2003) entre las principales tenemos:

Una enorme capacidad de multiplicación aplicable industrialmente, permite obtener en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz, que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente con las condiciones ambientales requeridas y la calidad y sanidad deseables. Permite desviarse de los procesos sexuales normales y producir posteriormente una población de plantas con las características de la planta original de la cual derivaba el explante primario, y proporciona información para una mejora de plantas en lo relacionado al saneamiento de enfermedades, conservación de germoplasma y selección de especímenes transformados.

2.7.4. Multiplicación Masiva de Vegetales Mediante la Organogénesis

La facilidad de usar la técnica de organogénesis para la multiplicación masiva produce material vegetal *in vitro* por la iniciación de brotes adventicios, bulbos, tubérculos, embriones asexuales o por crecimiento de brotes de yemas axilares y producción masiva de plántulas a partir de meristemos (Hurtado, 1998).

Existen varios propagadores comerciales, que ya tienen estandarizado el método de mantenimiento de un lote comercial de material madre *in vitro*, en donde, además de tener la ventaja de mantener este material, se considera el gran número que se puede mantener en un espacio reducido con las condiciones ambientales requeridas y la calidad y sanidad deseables. Esto es debido al potencial morfogénico que tienen los meristemos y otros tejidos de la planta en la producción de brotes. (Hurtado, 1998).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente estudio se llevó a cabo en las instalaciones de los Laboratorios de la Carrera de Ciencias Agropecuarias, Hacienda el Prado.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Materiales y Equipos

El equipo y los materiales de laboratorio utilizados fueron: autoclave, estufa, cámara de flujo laminar, estereoscopio, micrótopo, destilador, microondas, pH-metro, balanza analítica, agitador magnético, cámara fotográfica, cajas petri, frascos de vidrio 150ml, tubos de ensayo, micro pipetas, vasos de precipitación, Erlenmeyers, papel parafilm, tijeras, bisturís, papel toalla, papel aluminio.

3.2.2. Reactivos

3.2.2.1. Sales minerales

Las sales minerales utilizadas fueron: Nitrato de Amonio, Nitrato de Potasio, Fosfato Ácido de Amonio, Nitrato de Calcio, Sulfato de Potasio, Sulfato de Magnesio, Sulfato de Manganeso, Sulfato de Zinc, Sulfato de Cobre, Cloruro de Calcio, Cloruro de Cobalto, Ioduro de Potasio, Fosfato Ácido de Potasio, Ácido Bórico, Molibdato de Sodio, Sulfato Ferroso, Nitrato de plata, Sodio EDTA

3.2.2.2. Sustancias orgánicas

Dentro de las sustancias orgánicas se utilizó: Tiamina, Piridoxina , Ácido Nicotínico, Glycina, Polivinil Pirrolidona (PVP), Ácido Fólico, Riboflavina, Biotina,

Fosfato Ácido de Amonio, Ácido Cítrico, Picloram, Ácido Ascórbico, Myo Inositol, Sucrosa, Agar.

3.2.2.3. Hormonas

Las hormonas fueron: Ácido Indolbutírico (IBA), Benciladenina (BA) Thidiazuron (TDZ), Ácido Naftalenacético (NAA)

3.2.2.4. Otros materiales

Dentro de otros materiales se utilizó: Formaldehído, Ácido Acético Glacial, Alcohol 70% y 96% y 100%, Xileno, Cera de Parafina, Glicerol, Orseína.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Obtención del Material Vegetal

El material vegetal se obtuvo de hojas provenientes de plantas de *Rosa sp* var. Akito mantenidas en cultivo *in vitro* en el Área de Tejidos Vegetales de la Carrera de Ciencias Agropecuarias.

Cada dos o tres semanas, las plantas de rosas cultivadas *in vitro*, fueron multiplicadas para obtener el número de plantas necesarias para que provean la cantidad de hojas requeridas para realizar los ensayos.

Para la multiplicación, se utilizaron fragmentos de tallo con un nudo que se colocaron en un medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 100 mgxI⁻¹ Myo Inositol, 150 mgxI⁻¹ PVP, 50 mgxI⁻¹ Ácido Cítrico, 50 mgxI⁻¹ Ácido Ascórbico, 5 mgxI⁻¹ BAP, 1 mgxI⁻¹ AIA, 3% Sucrosa y 0.6% Agar. El pH del medio fue ajustado a 5.8 antes de ser autoclavado. El procedimiento anterior se realizó en frascos de vidrio con capacidad de 150 ml. El cuarto de crecimiento en donde se mantuvieron a las plantas, estuvo a una temperatura promedio de 22.5°C, una humedad relativa del 63% y una intensidad lumínica de 2500 lux durante dieciséis horas diarias.

3.3.2. Poda de Plantas

Para la poda de las plantas se utilizó el procedimiento sugerido por Pati *et al.*, (2004), igual utilizando hojas juveniles de plantas mantenidas *in vitro*. Para la obtención de dichas hojas se podaron las plantas y transcurridas cuatro semanas se procedió a la extracción de las mismas.

3.3.3. Fase de Regeneración *in vitro*

3.3.3.1. Medio de inducción

Al finalizar las cuatro semanas, de acuerdo a lo descrito por Pati *et al.*, (2004), se seccionaron las hojas en la base y se las introdujo abaxialmente con el peciolo en cajas petri en medio de inducción constituido por la mitad de concentración de sales MS suplementado con 3 mg l^{-1} de Nitrato de Plata (AgNO_3) el cual se filtró, esterilizó y se agregó al medio después de autoclavar. (Escaletes y Dosba 1993).

Además se aplicó diferentes dosis de Thidiazuron (TDZ) y de Ácido Naftalenacético (ANA) (Cuadro 3.3.3.1.1). Antes de añadir el agar (0,75%), el pH se ajustó a 5,8. Luego de introducidas las hojas en las cajas, se las mantuvo por 3 días en oscuridad (Dubois y de Vries, 1993, citado por Pati *et al.*, 2004).

Las condiciones de oscuridad impiden la fenolización de los explantes (Marulanda, 2004). La fenolización es la liberación de compuestos fenólicos, la oxidación fenólica aparece como consecuencia de los cortes durante la preparación de los explantes (Figura 4.5.3.). Los compuestos oxidados son altamente fitotóxicos, lo cual puede llegar a producir la muerte de los explantes. (Hu & Wang, 1983, citado por Sotolongo *et al.*, 2003).

Cuadro 3.3.3.1.1. Dosis de TDZ y ANA para la inducción de brotes

Variantes del medio	Dosis de TDZ (mgxl⁻¹)	Dosis de ANA (mgxl⁻¹)
T1	0,5	0,01
T2	1,0	0,01
T3	1,5	0,01
T4	0,5	0,05
T5	1,0	0,05
T6	1,5	0,05
T7	0,5	1,0
T8	1,0	1,0

T9	1,5	1,0
T10*	0	0

*Testigo MS (Mitad de concentración) suplementado con $3 \text{ mgx}l^{-1}$ de AgNO_3

Se realizaron cuatro ensayos con el medio de inducción:

- a) **Ensayo 1 (E1).**- Los explantes fueron colocados en el medio de inducción bajo 2300 lux y se transfirieron al medio de regeneración a los 14 días. A los 14 días se evaluó el número de brotes que se formaron.

- b) **Ensayo 2 (E2).**- Los explantes fueron colocados en el medio de inducción bajo 2300 lux y se transfirieron al medio de regeneración a los 21 días. A los 14 y 21 días se evaluó el número de brotes que se formaron.

c) **Ensayo 3 (E3).**- Los explantes fueron colocados en el medio de inducción bajo 2300 lux y se transfirieron al medio de regeneración a los 28 días. A los 14, 21 y 28 días se evaluó el número de brotes que se formaron.

d) **Ensayo 4 (E4).**- Los explantes fueron colocados en el medio de inducción suplementado con 30% de sucrosa bajo 2300 lux y se transfirieron al medio de regeneración a los 28 días. A los 14, 21 y 28 días se evaluó el número de brotes que se formaron.

Para medir el efecto real de TDZ y ANA en la formación de brotes, se realizaron tres ensayos sin sucrosa.

Para los cuatro ensayos las variables se midieron en los tiempos indicados en cada ensayo. Las variables evaluadas fueron:

Número de brotes regenerados.- Se define como el número de brotes obtenidos en cada tratamiento a partir de una hoja seccionada en la base e introducida en el medio de inducción.

Días a la formación de brotes.- Es el número de días que transcurren desde la introducción de las hojas al medio de inducción hasta la formación de brotes.

Fenolización.- Es el número de explantes que presentan pardeamiento en sus tejidos.

Para los cuatro ensayos, en el tratamiento testigo absoluto, se utilizó la mitad de concentración de MS con $3 \text{ mgx}1^{-1}$ de Nitrato de Plata (AgNO_3) sin adición de hormonas.

Los ensayos se dispusieron en un diseño en Bloques Completos al Azar (DBCA) en arreglo factorial ($3 \times 3 \times 3 + 1$) con tres repeticiones.

El modelo matemático para el análisis de las variables fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = u + N_i + Z_j + D_k + N*Z_{ij} + N*D_{ik} + Z*D_{jk} + N*Z*D_{ijk} + e_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = variable aleatoria

u = media general

N_i = efecto del i-ésimo nivel de ANA

Z_j = efecto de la j-ésima nivel de TDZ

D_k = efecto de la k-ésima días

$N*Z_{ij}$ = efecto de la interacción ANA x TDZ

$N*D_{ik}$ = efecto de la interacción ANA x días

$Z*D_{jk}$ = efecto de la interacción TDZ x días

$N*Z*D_{ijk}$ = efecto de la interacción ANA x TDZ x días

e_{ijk} = error experimental

Se realizaron pruebas de comparación de medias de Tukey al 5 % para TDZ, ANA días e interacciones.

Además los datos de las variables se analizaron con estadística descriptiva (media y error estándar) y diferentes técnicas de gráficas.

3.3.3.2. Medio de regeneración

Transcurridos los tiempos de cada ensayo, se transfirieron los explantes a cajas petri con medio de regeneración, el cual consistió en un medio basal de MS suplementado con 0,75% de agar, 0.5 mgxl^{-1} de BA y 0.01 mgxl^{-1} ANA. Los tres primeros días las cajas se colocaron en oscuridad (Dubois y de Vries, 1993, citado por Pati *et al.*, 2004).

En el medio de regeneración, se evaluó el número de brotes formados por los explantes que estuvieron expuestos en el medio de inducción en los diferentes tiempos de cada ensayo. A los 14, 21 y 28 días se evaluaron las siguientes variables:

Número de brotes regenerados.- Es el número de yemas obtenidas en cada tratamiento a partir de una hoja seccionada en la base e introducida en el medio de regeneración.

Días a la formación de brotes.- Es el número de días que transcurren desde la introducción de las hojas al medio de regeneración hasta la formación de brotes.

Fenolización.- Es el número de explantes que presentan pardeamiento en sus tejidos.

3.3.4. Pruebas de Histología

Para esta fase se utilizaron las yemas brotadas que se obtuvieron en la fase de regeneración, en las diferentes fases de desarrollo (Pati *et al.*, 2004).

3.3.4.1. Fijación y deshidratación

Los brotes fueron fijados en una solución que contuvo 70% de etanol, 40% formol y Ácido glacial acético (en una proporción 17:2:1 v/v/v/) según las recomendaciones de de Neergard (1997). Después se los introdujo en las siguientes soluciones:

- a) **70% etanol** por 1-2 horas
- b) **70% etanol** durante toda la noche
- c) **96% etanol** por 2-4 horas
- d) **96% etanol** por 2-4 horas
- e) **100% etanol** por 2-4 horas

3.3.4.2. Inclusión en cera de parafina

La inclusión en cera de parafina se las realizó según la metodología de de Neergard, (1997).

El procedimiento comienza con la deshidratación de los brotes en 100% de etanol.

- a) **100 % etanol** por toda la noche
- b) **100 % etanol+ xileno 3+1** por 2 horas
- c) **100 % etanol+ xileno 1+1** por 2 horas
- d) **100 % etanol+ xileno1+3** por 2 horas
- e) **100 % xileno** por 2 horas

- f) **100 % etanol+ xileno** por toda la noche
- g) **Xileno + cera de parafina a 60°C** por 24 horas (en una estufa con ventilación)
- h) La cera de parafina líquida fue añadida durante los siguientes tres días hasta que el xileno se evaporó.
- i) Se realizaron moldes de cartulina de 1.5 cm³ y se los embebió con glicerol.
- j) Se colocó cera de parafina en la estufa 24 horas antes de utilizarla.
- k) La cera de parafina líquida se colocó en los moldes embebidos con glicerol hasta la mitad, sin dejar que la cera se condense.
- l) Se colocaron los brotes en los moldes y se los cubrió con parafina.
- m) Para conseguir una condensación rápida de la parafina, después de colocar un brote en un bloque y cubrirlo con la parafina, se lo introdujo en agua fría para impedir su cristalización.

3.3.4.3. Cortes de los bloques

- a) Se realizaron cortes longitudinales con ayuda del micrótopo, con un grosor de 10 µm.
- b) Cada cinta de parafina obtenida se colocó en agua fría para que se estire, se la recogió con una placa de vidrio.
- c) Las placas de vidrio con las cintas de parafina se calentaron en agua caliente para que las muestras se adhieran al vidrio.

3.3.4.4. Desparafinización de los cortes

Según de Neergard (1997), para la remoción de la cera de parafina se introdujo las placas de vidrio con los cortes en las siguientes mezclas:

- a) Xileno por 1 min
- b) Xileno+ etanol, 1+1 por 1 min
- c) 100% etanol por 1 min
- d) 100% etanol por 1 min
- e) 96% etanol por 1 min
- f) 70% etanol por 1 min
- g) 50% etanol por 1 min
- h) 30% etanol por 1 min
- i) Agua destilada por 1 min
- j) Finalmente se tiñeron las muestras con orseína para poder verlas al microscopio.

3.3.5. Proliferación de Brotes

Para la proliferación de yemas brotadas, se procedió a colocar los brotes en un medio semi-sólido MS con 3% de sucrosa, 5g de agar y se colocó tres dosis de Benciladenina (BA), en concentraciones baja, media, y alta (Cuadro 3.3.5.1). Cada cuatro semanas fueron transferidos a dos subcultivo.

Cuadro 3.3.5.1. Dosis de BA para la proliferación de yemas brotadas.

Dosis	Dosis de BA (mgxl⁻¹)
Baja	0.75
Media	1.126
Alta	2

Se asumió que el testigo absoluto, fue formulado en MS con 3% de sucrosa sin adición de BA. Se evaluaron las siguientes variables:

Número de yemas brotadas.- Es el número de yemas brotadas a partir de los brotes obtenidos en la fase de inducción e introducidas en los medios detallados en el cuadro 3.3.5.1.. Se introdujo en el medio, un brote por cada tubo.

Días a la formación de yemas brotadas.- Es el número de días que transcurren desde la introducción de los brotes al medio de proliferación hasta el inicio de formación de las yemas.

Los ensayos se dispusieron en un diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA) en arreglo factorial (3 x 3 + 1) con tres repeticiones.

El modelo matemático en el Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA), para el análisis de las variables fue el siguiente:

$$Y_{ij} = u + H_i + D_j + H*D_{ij} + e_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = variable aleatoria

u = media general

H_i = efecto del i-ésimo nivel de la hormona BA

D_j = efecto de la j-ésima días

$H*D_{ij}$ = efecto de la interacción de la hormona BA x días

e_{ij} = error experimental

Se realizaron pruebas de comparación de medias de Tukey al 5 % para la hormona BA, días e interacciones.

IV. RESULTADOS

4.1. COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE REGENERACIÓN MÁS ADECUADO Y DEL TIEMPO DE EXPOSICIÓN DE LOS EXPLANTES.

La información detallada en los cuadros, pertenece solo a los ensayos 3 y 4 debido a que en los ensayos 1 y 2, el promedio de brotes formado fue muy bajo y no se pudo hacer un análisis estadístico.

Se realizó un análisis no paramétrico de los valores obtenidos para tiempo de exposición, tratamientos, dosis de ANA y TDZ.

Cuadro 4.1.1. Análisis de la varianza para el número de brotes formados bajo la influencia de la exposición de hojas en el medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2008.

F de V	Ensayo 3	Ensayo 4
Modelo	0,0002	0,0002
Tiempo de exposición	0,3473	<0,0001
Tratamientos	0.0002	< 0,0001
Dosis ANA	< 0,0001	< 0,0001
Dosis TDZ	0,1718	0,724
Dosis ANAxTDZ	0,1616	0,2211
Coefficiente de variación	32,73	26,51

Al analizar el número de brotes en el ensayo 3, se determinó que no existió un efecto significativo del Tiempo de Exposición ($F_{2,78}=0,77$; $p= 0,3473$) y de la Dosis de TDZ ($F_{2,78}=0,47$; $p= 17,18$); mientras tanto se observó un efecto significativo para los Tratamientos ($F_{9,78}=1,07$; $p= 0.0002$) y para la Dosis de ANA ($F_{3,78}=2,30$; $p=<0,0001$) (Cuadro 4.1.1.).

En el ensayo 4, se determinó que existió un efecto significativo para el Tiempo de Exposición ($F_{2,78}=1,1 \times 10^{-4}$; $p < 0,0001$), un efecto significativo para los Tratamientos ($F_{9,78}=1,31$; $p < 0,0001$) y la Dosis de ANA ($F_{3,78}=3,33$ $p < 0,0001$); mientras que para la Dosis de TDZ no existió un efecto significativo ($F_{2,78}=0,09$; $p=0,7240$) (Cuadro 4.1.1.).

Cuadro 4.1.2. Promedio (\pm) del error estándar del número de brotes formados bajo diferentes tiempos de exposición en el medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2008.

Tiempos de exposición (días)	Ensayo 3	Ensayo 4
14	1,39 \pm 0,10 a	1,99 \pm 0,11 b
21	1,22 \pm 0,09 a	1,03 \pm 0,03 a
28	1,25 \pm 0,08 a	1,03 \pm 0,03 a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas, $p < 0,05$

En el Cuadro 4.1.2., en el ensayo 3 se puede apreciar que bajo el efecto de todos los tiempos de exposición, el promedio de número de brotes fue similar. Mientras que en el ensayo 4 se observa que a los 14 días fue cuando se presentó en promedio un mayor número de brotes (1,99 \pm 0,11).

Cuadro 4.1.3. Promedio (\pm) del error estándar del número de brotes formados bajo diferentes tratamientos, IASA I, Ecuador, 2008.

Tratamiento	Ensayo 3	Ensayo 4
1	1,33 \pm 0,44 d	2,23 \pm 0,12 b
2	1,11 \pm 0,11 cd	2,13 \pm 0,07 b
3	1,11 \pm 0,35 cd	1,90 \pm 0,25 b
4	0,22 \pm 0,15 a	1,80 \pm 0,21 b
5	0,67 \pm 0,29 abcd	2,00 \pm 0,25 b
6	1,00 \pm 0,17 bcd	2,27 \pm 0,07 b
7	0,33 \pm 0,17ab	2,07 \pm 0,32 b
8	0,56 \pm 0,24 abc	2,31 \pm 0,06 b
9	0,33 \pm 0,17 ab	2,13 \pm 0,07 b
10	0,00 \pm 0,00 a	0,00 \pm 0,00 a

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

En el Cuadro 4.1.3., se puede observar que al comparar el promedio del número de brotes formados en los diferentes tratamientos para el ensayo 3, se encontró que el tratamiento T1 (0,5 mgxl⁻¹ de TDZ y 0,01 mgxl⁻¹ de ANA) fue el que presentó mayor número de brotes (1,33 \pm 0,44) con respecto a los tratamientos T4, T7 y T8.

En el ensayo 4, se encontró que el número de brotes fue similar en todos los tratamientos, destacándose el tratamiento T8 ($1,0 \text{ mgxl}^{-1}$ de TDZ y $1,0 \text{ mgxl}^{-1}$ de ANA) ($2,31 \pm 0,06$) y el tratamiento T6 ($1,5 \text{ mgxl}^{-1}$ de TDZ y $0,05 \text{ mgxl}^{-1}$ de ANA) ($2,27 \pm 0,07$) (Cuadro 4.1.3.).

Cabe destacar que en el ensayo 3 y en el ensayo 4, el tratamiento T10 sin hormonas no presentó formación de brotes (Cuadro 4.1.3.).

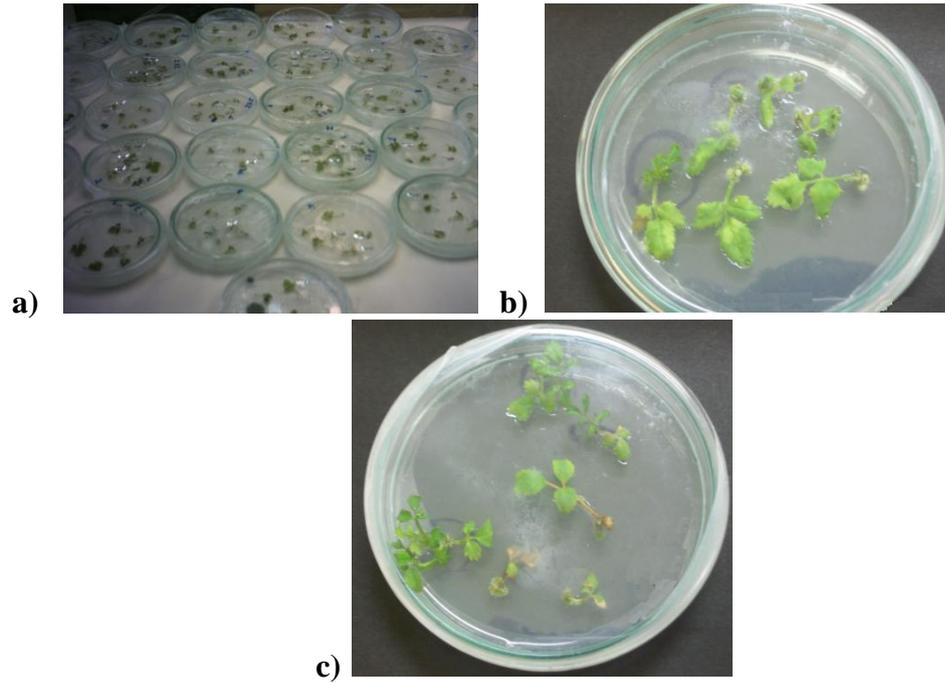


Figura 4.1.3. a) Explantes expuestos a los diferentes tratamientos en medio de

Cuadro 4.1.4 Promedio (\pm) del error estándar del número de brotes formados bajo el efecto de las diferentes dosis de ANA, IASA I, Ecuador, 2008.

Dosis ANA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Ensayo 3	Ensayo 4
0	0,00 \pm 0,00 a	0,00 \pm 0,00 a
0,01	1,19 \pm 0,19 c	2,09 \pm 0,09 b
0,5	0,63 \pm 0,13 b	2,02 \pm 0,11 b
1	0,41 \pm 0,11 ab	2,17 \pm 0,11 b

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Al analizar los resultados obtenidos con las diferentes dosis de ANA en el ensayo 3, se encontró que la dosis 0.01 mgxl^{-1} fue la que mayor promedio de número de brotes formados generó (1.19 ± 0.19) mientras que la dosis 0 mgxl^{-1} no tuvo formación de brotes (Cuadro 4.1.4).

En el ensayo 4, se puede observar que bajo el efecto de la dosis $0,01 \text{ mgxl}^{-1}$, $0,5 \text{ mgxl}^{-1}$ y 1 mgxl^{-1} el número de brotes formados fue similar, diferenciándose con la dosis 0 mgxl^{-1} que no produjo brotes (Cuadro 4.1.4).

Cuadro 4.1.5. Promedio (\pm) del error estándar del número de brotes formados bajo el efecto de las diferentes dosis de TDZ, IASA I, Ecuador, 2008.

Dosis TDZ (mgxl^{-1})	Ensayo 3	Ensayo 4
0	$0,00 \pm 0,00$ a	$0,00 \pm 0,00$ a
0,5	$0,63 \pm 0,19$ b	$2,03 \pm 0,13$ b
1	$0,78 \pm 0,13$ b	$2,15 \pm 0,09$ b
1,5	$0,81 \pm 0,15$ b	$2,10 \pm 0,09$ b

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

En el Cuadro 4.1.5., en el ensayo 3 se puede observar que el promedio de número de brotes formados bajo las dosis $0,5 \text{ mgxl}^{-1}$, 1 mgxl^{-1} y $1,5 \text{ mgxl}^{-1}$ fue similar, diferenciándose con la dosis 0 mgxl^{-1} que no produjo brotes.

En el ensayo 4, a diferencia de la dosis $0 \text{ mgx}l^{-1}$, en las otras tres se generaron similar número de brotes.

4.2. MEDIO DE INDUCCIÓN Y MEDIO DE REGENERACIÓN

4.2.1. Medio de Inducción

Al analizar la Figura 4.2.1.1., se puede determinar que en el medio de inducción el ensayo realizado con sucrosa, ensayo 4, tuvo mayor porcentaje de brotes (23,33%), mientras que dentro de los ensayos realizados sin sucrosa, ensayos 1, 2 y 3, el ensayo que presentó mayor número de brotes fue el ensayo 3 (15%).

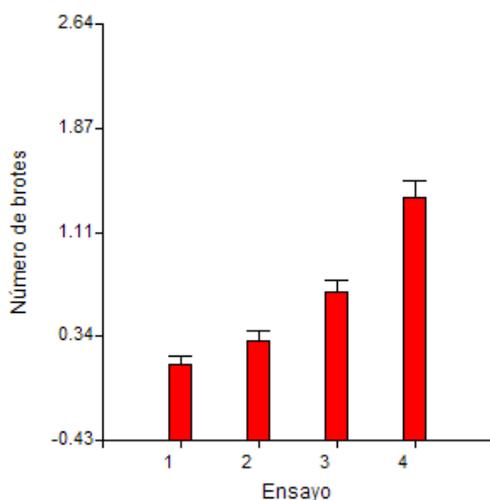


Figura 4.2.1.1. Número de brotes formados en el medio de inducción en los diferentes ensayos, IASA I, Ecuador, 2008.



Figura 4.2.1.2. Brotes regenerados en el medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2008.

4.2.2. Medio de Regeneración

Al analizar la Figura 4.2.2.1., se puede establecer que en el Medio de Regeneración, el ensayo 2 fue el que presentó mayor número de brotes

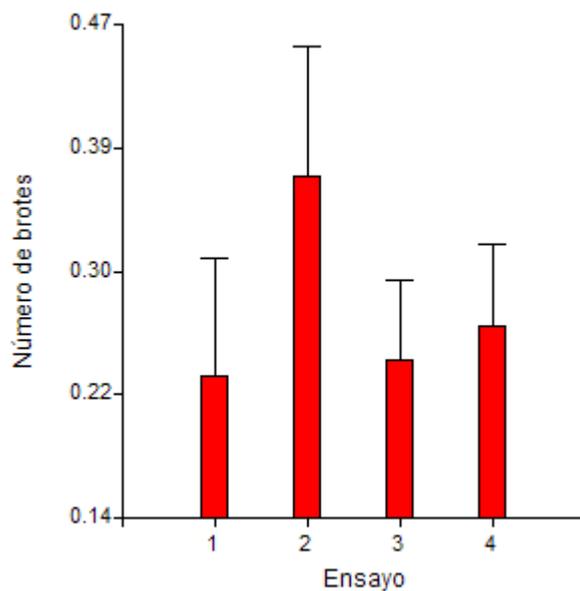


Figura 4.2.2.1. Número de brotes formados en el medio de regeneración en los diferentes ensayos, IASA I, Ecuador, 2008.



Figura 4.2.2.2. Brotes regenerados en el medio de regeneración, IASA I, Ecuador, 2008.

4.3. PRUEBAS DE HISTOLOGÍA

En la Figura 4.3.1., se puede observar un corte histológico de un brote, en el que se observa la presencia de tejido meristemático apical que se encuentra rodeado por primordios foliares.

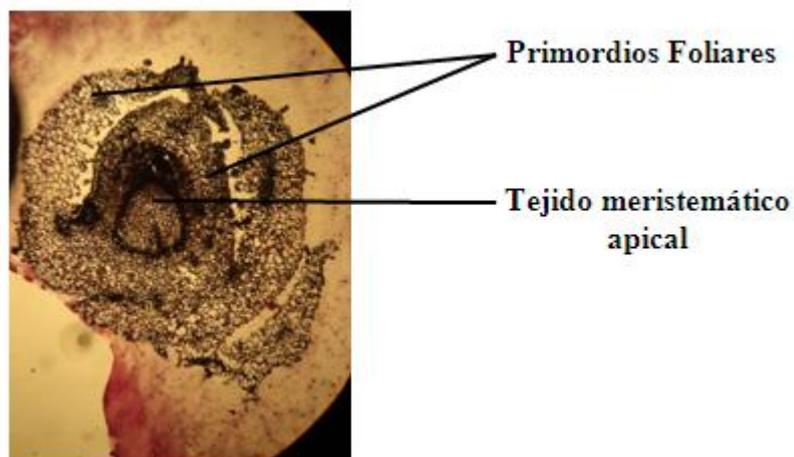


Figura 4.3.1. Corte histológico de un brote de rosa, IASA I, Ecuador, 2008.

4.4. PROLIFERACIÓN DE BROTES

Como se observa en la Figura 4.4.1., mientras se incrementan las dosis de BA, el número de brotes también aumenta. Al realizar la primera derivada a la ecuación $Y = 1,65x^2 - 1,31x + 1,01$, se encontró que la dosis mínima de BA para la regeneración de brotes fue de $0,741 \text{ mgxl}^{-1}$.

$$1,65x^2 - 1,31x + 1,01 = 0$$

$$2(1,65)x - 1,31 = 0$$

$$x = 0,397$$

$$Y = 1,65(0,397)^2 - 1,31(0,397) + 1,01$$

$$Y = 0,26 - 0,52 + 1,001$$

$$Y = 0,741$$

Con la dosis más alta de 2 mgxl^{-1} de BA, se encontró mayor número de brotes, mientras que con la dosis de $0,75 \text{ mgxl}^{-1}$ de BA y la de 0 mgxl^{-1} de BA no hubo formación de brotes.

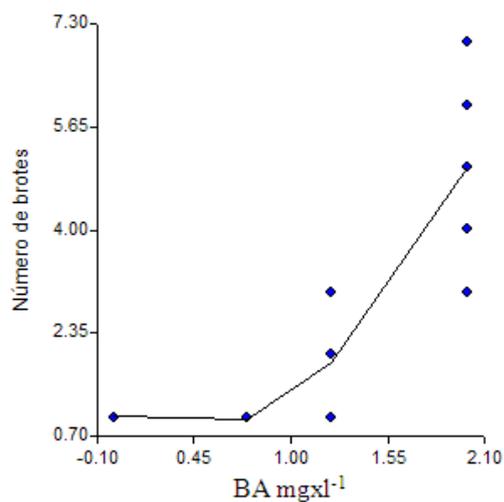


Figura 4.4.1. Relación entre el número de brotes formados bajo el efecto de las diferentes dosis de BA, IASA I, Ecuador, 2008.



4.5. FENOLIZACIÓN

La fenolización se caracterizó por un cambio en la coloración del tejido vegetal, pasando de color verde a café.

En la Figura 4.5.1., se puede observar que en el ensayo 1 se presentó mayor número de brotes fenolizados. Mientras que en el ensayo 4 hubo menor fenolización.

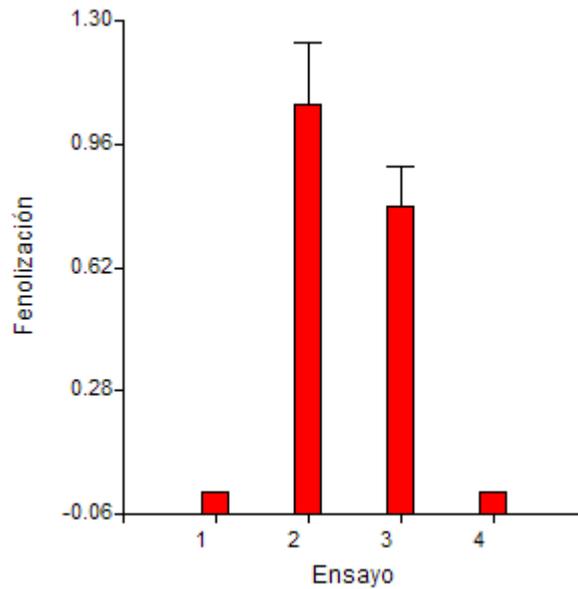


Figura 4.5.1. Número de brotes fenolizados en el medio de inducción, IASA I, Ecuador, 2008.

En la Figura 4.5.2., se puede ver que en el ensayo 2 se encontró mayor fenolización mientras que en los ensayos 1 y 4 se encontró menor número de brotes fenolizados.

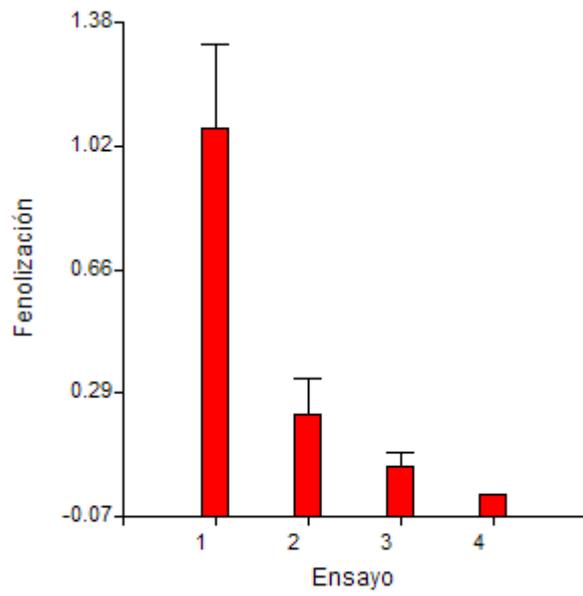


Figura 4.5.2. Número de brotes fenolizados en el medio de regeneración, IASA I, Ecuador, 2008.



Figura 4.5.3. Brotes fenolizados, IASA I, Ecuador, 2008.

V. DISCUSIÓN

En la presente investigación, realizada en *Rosa sp.* Var Akito, se obtuvo una regeneración directa de brotes adventicios a partir de explantes de hojas en la base del peciolo (Figura 4.2.1.1 y Figura 4.2.2.2.), lo que también se ha evidenciado en estudios similares realizados en *R. hybrida* (Dubois y de Vries, 1995) y en otras especies de la familia Rosaceae como: *Prunus canescens* (Antonelli y Druart, 1990), *Rubus idaeus* (Cousineau y Donnelly, 1991), *Prunus armeniaca* y *Prunus domestica* (Escalettes y Dosba, 1993).

En el medio de inducción, suplementado con sucrosa y un tiempo de exposición de los explantes durante 28 días (ensayo 4), la formación de brotes fue mayor. (Figura 4.2.1.1.). Mientras que para los ensayos en los que no hubo adición de sucrosa (ensayos 1, 2 y 3), también se encontró que hubo mayor brotación a los 28 días (ensayo 3). Según George, (1996), esto se justifica debido a que sin la adición de sucrosa al medio, los explantes no tienen fuente de carbono que permita una adecuada multiplicación celular, por lo que se genera una menor formación de brotes.

La cantidad de luz también está ligada a los resultados obtenidos ya que como se menciona en estudios realizados en *Prunus persica* por Korban *et al.*, (1992) y Miguel *et al.*, (1996), citados por Gentile *et al.*, (2002), señalan que la luz induce a la organogénesis.

Para el medio de regeneración, se encontró que con un tiempo de exposición de 15 días (ensayo 2), se genera mayor número de brotes (Figura 4.2.2.1.); lo que se corrobora con investigaciones realizadas por Pati *et al.*, (2004), en *Rosa damascena* y por Dubois y de Vries (2000) para los que los períodos de tiempo acorde fueron de 14 a 21 días y de 12 a 18 días respectivamente.

Pati *et al.*, (2004), indican que en la fase de regeneración los explantes sean expuestos a un medio de inducción y a un medio de regeneración, no obstante, los resultados encontrados en este estudio demuestran que no es necesario ya que hubo mayor formación de brotes en el medio de inducción que en el de regeneración (Figura 4.2.1.1. y Figura 4.2.2.1).

El ensayo 4, fue el ensayo en el que la mayoría de tratamientos generaron brotes, presentando un 85,19% de los tratamientos que presentaron regeneración, seguido por el ensayo 3 que tuvo un 66,17% y por el ensayo 2 que tuvo un 29,53%. En el ensayo 1 se encontró el menor porcentaje que fue de 18,52%.

En el ensayo 3, la combinación óptima de TDZ y ANA que indujo mayor formación de brotes adventicios en el peciolo de las hojas (Figura 5.3.1.), se encontró en el tratamiento T1 que consistió en 0.5 mgxl^{-1} de TDZ y 0.01 mgxl^{-1} de ANA. En cambio, en el ensayo 4 fue el tratamiento T8 con una dosificación de 1 mgxl^{-1} de TDZ y 1 mgxl^{-1} de ANA. En *Rosa damascena*, Pati *et al.*, (2004) y en *R. hybrida* (Dubois y de Vries, 1993, citado por Pati *et al.*, 2004) se encontraron que las dosis óptimas fueron de 1.5 mgxl^{-1} de TDZ y 0.05 mgxl^{-1} de ANA.

En los ensayos realizados, se encontró que al aumentar la concentración de TDZ hubo mayor crecimiento de brotes, esto se podría justificar porque el TDZ, se encuentra entre una de las citoquininas más activas, como regulador de crecimiento en la proliferación de brotes *in vitro* en comparación con otras citoquininas (Khawar *et al.*, 2004). Lo indicado se ha demostrado en estudios realizados en muchas especies de la familia *Rosaceae*, en los que se resalta la eficacia y aumento de la

regeneración de brotes mediante el uso de TDZ (Leblay *et al.*, 1997; Sarwar y Skirvin, 1997; Lane *et al.*, 1998, citados por Pati *et al.*, 2004). Según Zhou JY *et al.* (1994), el TDZ es responsable del rompimiento de la dormancia de los brotes, promueve la proliferación de brotes e induce la organogénesis *in vitro* en muchas especies.

Los brotes que se formaron en la base del peciolo de las hojas, fueron de regeneración directa lo que se evidenció realizando pruebas histológicas y observando los cortes al microscopio, en los que se evidenció la presencia de tejido meristemático apical rodeado de primordios foliares. (Figura 4.3.1)

En los reportes de Vijaya *et al.*, (1991), citado por Khosravi *et al.*, (2007), se observa que el BA es el regulador de crecimiento más efectivo en cuanto a la estimulación de brotes justificando los resultados encontrados en la fase de proliferación en donde la dosis más acertada de BA para la proliferación de brotes fue de 2 mg l^{-1} (Figura 4.4.2.c), mientras que para Pati *et al.*, (2004) en *R. damascena* la dosis fue de 1.26 mg l^{-1} (Figura 4.4.1.).

La Dosis Alta (2 mg l^{-1}), no solo fue la que mayor porcentaje de brotes generó, sino que también presentó mayor número de brotes por explante regenerado, llegando a obtener de 3 a 7 brotes por explante. Mientras que la dosis mínima para obtener formación de brotes fue de $0,74 \text{ mg l}^{-1}$.

La fenolización registrada en los ensayos es baja. Los porcentajes de fenolización resultaron más bajos en el Medio de Inducción debido a la adición de AgNO_3 al medio. El AgNO_3 es conocido por la acción inhibidora de la producción de etileno en tejidos vegetales, disminuyendo la senescencia de las hojas. Escaletes y Dosba (1993).

El sistema de micropropagación de plantas a través de organogénesis directa a partir de hojas, en comparación con la micropropagación por estacas tiene similares resultados, en el primero el número de esquejes obtenidos tiene una relación de 1:10 y el tiempo de regeneración es de dos meses. En el segundo, el número de esquejes obtenidos tiene una relación de 1:8 y el tiempo de regeneración se demora 2 meses. Lo señalado demuestra que la organogénesis directa es una alternativa complementaria para mayor producción de plantas.

VI. CONCLUSIONES

Las hojas provenientes de plantas in vitro de rosa, variedad Akito, constituyen un excelente material vegetal para regeneración de brotes.

El efecto real de TDZ y ANA para regeneración del mayor número de brotes en medios nutritivos sin sucrosa, se logró con dosis de $0,5 \text{ mgxl}^{-1}$ y $0,1 \text{ mgxl}^{-1}$ respectivamente, obteniéndose un 9,25% de brotes.

El efecto real de TDZ y ANA para regeneración del mayor número de brotes en medios nutritivos con sucrosa, se logró con dosis de 1 mgxl^{-1} de TDZ y 1 mgxl^{-1} de ANA, obteniéndose un 11,11% de brotes.

En los explantes tratados con TDZ y ANA, con y sin sucrosa se logró organogénesis directa, lo que se evidenció con los cortes histológicos.

La dosis óptima para regeneración de brotes es de $0,5 \text{ mgxl}^{-1}$ de TDZ y $0,1 \text{ mgxl}^{-1}$ de ANA.

Con dosis de 2 mgxl^{-1} de BA se logró el mayor número de brotes para proliferación. La dosis de 0,75 de BA fue la que menor número de brotes generó.

El Nitrato de Plata, evita la fenolización y garantiza un mejor desarrollo los brotes.

Este sistema de micropropagación es una técnica complementaria a la micropropagación por estacas debido a que permite incrementar el aprovechamiento del material vegetativo, consiguiendo un mayor número de plantas.

VII. RECOMENDACIONES

En el medio de inducción se recomienda la dosificación de 0.5 mgxl^{-1} de TDZ y 0.01 mgxl^{-1} de ANA ya que permite obtener estadísticamente el mismo número de brotes que con la dosis recomendada de 1 mgxl^{-1} de TDZ y 1 mgxl^{-1} de ANA ya que económicamente resulta más rentable.

Es importante adicionar 3 mgxl^{-1} de Nitrato de Plata al medio de inducción para evitar la fenolización y tener un desarrollo óptimo de los brotes.

Para la obtención de buenos cortes histológicos, es recomendable el uso de etanol y xileno antes de la inclusión de los brotes en cera de parafina.

Es primordial realizar investigaciones sobre la estabilidad genética del material micropropagado para determinar la posible variabilidad somaclonal generalmente causada por repiques.

VIII. RESUMEN

La rosa es originaria del Asia Central, es uno de los productos que aporta grandes divisas al país debido a su exportación a Estados Unidos y a países europeos. Su productividad se ha visto afectada por problemas fitosanitarios en el momento de la propagación. El presente estudio se realizó con la finalidad de regenerar brotes a partir de hojas provenientes de plantas *in vitro* de rosa, variedad Akito.

El ensayo consistió en micropropagar brotes de rosa a partir de explantes de hojas. Las hojas jóvenes se consiguieron después de 4 semanas de haber podado las plantas. En la fase de inducción se encontró que las dosis óptimas de TDZ y de ANA fueron 0.5 mgxl^{-1} y 0.01 mgxl^{-1} respectivamente. En la fase de proliferación la dosis de BAP que generó mayor número de brotes fue 2 mgxl^{-1} . La mayor regeneración de brotes se registró en los explantes mantenidos en el medio de inducción durante 28 días. Las pruebas histológicas registraron regeneración directa de los brotes obtenidos.

