

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIEROS EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:
DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA EL CULTIVO *IN VITRO* DE *Rosa chinensis***

**AUTORES:
JAEL ARASELI ALVAREZ ACUÑA
MARCO VINICIO POZO CRUZ**

**DIRECTORA:
IVONNE DE LOS ÁNGELES VACA SUQUILLO**

Quito, enero del 2021

Cesión de derechos de autor

Nosotros Jael Araseli Alvarez Acuña y Marco Vinicio Pozo Cruz con documento de identificación N° 1727004077 y N° 1724876410, respectivamente. Manifestamos nuestra voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: “DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA EL CULTIVO *IN VITRO* DE *Rosa chinensis*” mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieros en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Jael Araseli Alvarez Acuña

1727004077



Marco Vinicio Pozo Cruz

1724876410

Quito, enero del 2021

Declaratoria de coautoría del docente tutor/a

Yo, Ivonne Vaca Suquillo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA EL CULTIVO *IN VITRO* DE *Rosa chinensis* realizado por Jael Araseli Alvarez Acuña y Marco Vinicio Pozo Cruz obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, enero de 2021


Nombre: Ivonne Vaca Suquillo

Cédula de identidad: 1714726906

Dedicatoria

A Dios por bendecirme a lo largo de mi vida y permitirme llegar hasta este punto, en el cual he logrado mis objetivos y culminado con éxito este trabajo de investigación.

A mi familia por el amor, confianza, motivación y paciencia para seguir adelante y cada día ser mejor.

Jael Alvarez

A Dios por acompañarme durante toda mi existencia, por ser ese padre tan bueno, al permitirme alcanzar otra meta en vida, gracias por darme tantos momentos felices y por ser la luz que guía mi vida.

A mis padres, Marco y Giojana por brindarme su cariño y apoyo incondicional, por darme las fuerzas necesarias para nunca rendirme, gracias por haberme inculcado el amor a Dios desde mi infancia.

A mi hermana, Scarlet por haberme apoyado en cada etapa de mi vida, porque mediante sus consejos y motivaciones soy el ser humano que soy.

Marco Vinicio Pozo Cruz

Agradecimiento

A la Universidad Politécnica Salesiana por haber hecho factible el presente trabajo de investigación.

A nuestra distinguida tutora MSc. Ivonne Vaca Suquillo, por haber confiado en nosotros, al permitirnos formar parte de su grupo de investigación, gracias por ser parte de nuestro camino estudiantil y por todo el apoyo incondicional que recibimos a diario de usted.

A los docentes MSc. Laura Huachi, MSc. Viviana Chiluisa, MSc. Daniel Acurio, por haber impartido en cada uno de nosotros sus conocimientos, valores y principios; gracias por su amistad y por ser del tipo de maestros que hacen diferente al mundo.

A los colaboradores del proyecto Sofía Salazar y Sebastián Pillalaza por su apoyo, disposición y su ayuda, dado que hicieron posible la realización de esta investigación.

Contenido

Introducción	1
Capítulo 1	3
1 Marco Teórico	3
1.1 <i>Rosa chinensis</i>	3
1.1.1 Distribución.....	3
1.1.2 Taxonomía.....	4
1.1.3 Descripción.....	5
1.1.4 Plagas y enfermedades	5
1.1.5 Propagación.....	6
1.1.6 Antecedentes del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Rosa chinensis</i>	7
1.2 Cultivo <i>in vitro</i> y morfogénesis	8
1.2.1 Generalidades	8
1.2.2 Morfogénesis.....	9
1.2.3 Medio de cultivo.....	11
1.2.4 Condiciones ambientales.....	15
1.2.5 Fases del cultivo <i>in vitro</i>	16
1.2.6 Problemas en el cultivo <i>in vitro</i>	20
Capítulo 2	22
2 Metodología	22
2.1 Localización del ensayo.....	22
2.2 Selección, colecta y transporte del material vegetal.....	22

2.3	Fase I: Desinfección de los explantes y evaluación de antimicrobianos.....	23
2.3.1	Protocolo de desinfección	23
2.3.2	Medio de introducción	23
2.3.3	Unidad experimental	24
2.3.4	Análisis estadístico.....	24
2.3.5	Variables y métodos de evaluación.....	25
2.4	Fase II: Organogénesis	27
2.4.1	Factores de estudio	28
2.4.2	Unidad experimental	28
2.4.3	Análisis estadístico.....	28
2.4.4	Variables y métodos de evaluación.....	29
2.5	Fase III: Aclimatación <i>ex vitro</i>	30
2.5.1	Unidad experimental	30
2.5.2	Análisis estadístico.....	30
2.5.3	Variables y métodos de evaluación.....	31
Capítulo 3	33
3	Resultados y discusión	33
3.1	Fase 1: Evaluación de antimicrobianos	33
3.1.1	Contaminación bacteriana	34
3.1.2	Contaminación fúngica	36
3.1.3	Fenolización	36
3.1.4	Callogénesis	38

3.1.5	Brotación y longitud del brote.....	38
3.2	Fase II: Organogénesis	41
3.2.1	Brotación	42
3.2.2	Rizogénesis.....	43
3.2.3	Callogénesis	46
3.2.4	Longitud del brote	48
3.3	Fase 3: Aclimatación <i>ex vitro</i>	51
3.3.1	Sobrevivencia	52
3.3.2	Enraizamiento.....	54
3.3.3	Altura de la vitroplanta.....	55
	Conclusiones	57
	Recomendaciones.....	58
	Bibliografía.....	59
	Anexos.....	88

Índice de tablas

Tabla 1. Protocolo de desinfección aplicado a explantes de <i>R. chinensis</i> , en la fase de introducción.....	23
Tabla 2. Antimicrobianos utilizados para la inducción de brotes en <i>Rosa chinensis</i> al medio de cultivo.....	24
Tabla 3. Concentración de sales y posición de siembra de los explantes de <i>Rosa chinensis</i> ...	27
Tabla 4. Sustratos utilizados en la fase de aclimatación <i>ex vitro</i> de <i>R. chinensis</i>	30
Tabla 5. Medianas para las variables contaminación bacteriana, contaminación fúngica, fenolización, callogénesis y brotación, y medias para la variable longitud del brote; en la fase de evaluación de antimicrobianos.	33
Tabla 6. Medianas para las variables brotación, rizogénesis, y medias para las variables callogénesis y longitud del brote, al evaluar la concentración de sales MS, posición de siembra y su interacción, en la fase de organogénesis.....	42
Tabla 7. Medianas para las variables sobrevivencia y enraizamiento, y medias para la variable altura de la vitroplanta, en la fase de aclimatación <i>ex vitro</i>	52

Índice de figuras

Figura 1. Planta donadora de <i>R. chinensis</i>	22
Figura 2. a) Segmentos nodales de <i>R. chinensis</i> ; b) Protocolo de desinfección.	23
Figura 3. Contaminación bacteriana en explantes de <i>R. chinensis</i>	25
Figura 4. Formación de hongos sobre el medio y explante.....	26
Figura 5. a) Formación de células callosas; b) Ausencia de callos en explantes de <i>Rosa chinensis</i>	26
Figura 6. a) Emisión de brote; b) Yema brotada con hojas iniciales.	27
Figura 7. Posición de siembra de los explantes a) 90 °; b) 45 °.	28
Figura 8. Rizogénesis <i>in vitro</i> a y b) Formación de raíces adventicias en la base de la yema; c) Formación de pelos absorbentes en las raíces.	29
Figura 9. Vitroplantas de <i>Rosa chinensis</i> climatizadas.	31
Figura 10. Medias y medianas para la variable porcentaje de contaminación bacteriana, durante la fase de evaluación de antimicrobianos.	34
Figura 11. Medias y medianas para la variable porcentaje de fenolización, durante la fase de evaluación de antimicrobianos.	37
Figura 12. a) Medias y medianas para la variable brotación; b) Medias para la variable longitud del brote, durante la fase de evaluación de antimicrobianos.....	39
Figura 13. a y b) Formación de brotes en yemas de <i>Rosa chinensis</i> , bajo el efecto de Metilparabeno (100 mg/L); c) Yema sin brotación, bajo el efecto de Tetraciclina (35 mg/L).40	
Figura 14. Medias y medianas para la variable rizogénesis, según la posición de siembra del explante durante la fase de organogénesis.	43
Figura 15. a, b, c) Desarrollo radicular en yemas de <i>R. chinensis</i> a 45 °; d) Ausencia de raíces adventicias en yemas a 90 °.....	44

Figura 16. Medias y medianas para la variable rizogénesis según la interacción de sales y posición de siembra del explante, durante la fase de organogénesis.	45
Figura 17. Medias para la variable callogénesis, según la concentración de sales, durante la fase de organogénesis.....	47
Figura 18. Medias para la variable longitud del brote, según la concentración de sales, durante la fase de organogénesis.	48
Figura 19. Medias para la variable longitud del brote, según la interacción de sales y posición de siembra, durante la fase de organogénesis.	49
Figura 20. Plántulas de <i>R. chinensis</i> a) S1P1 (¼ MS; 90 °); b) S1P2 (¼ MS; 45 °); c) S2P1 (½ MS; 90 °); d) S2P2 (½ MS; 45°).	50
Figura 21. Medias para la variable sobrevivencia, durante la fase de aclimatación <i>ex vitro</i> . .	53
Figura 22. Medias para la variable enraizamiento, durante la fase de aclimatación <i>ex vitro</i> ..	54
Figura 23. Medias para la variable altura de la vitroplanta, durante la evaluación de sustratos, en la fase de aclimatación <i>ex vitro</i>	55
Figura 24. Vitroplantas de <i>R. chinensis</i> adaptadas a sustrato a y b) Turba; c) Tierra negra ...	56

Índice de anexos

Anexo 1. Medio de cultivo, macro y micronutrientes, vitaminas y aminoácidos del medio MS.	88
Anexo 2. Medianas y medias para la variable contaminación fúngica, durante la fase de evaluación de antimicrobianos.	89
Anexo 3. Medianas y medias para la variable callogénesis, durante la fase de evaluación de antimicrobianos.	90
Anexo 4. Medianas y medias para la variable brotación, durante la fase de organogénesis...	91

Resumen

La rosa es una de las especies más cultivadas y solicitadas como flor de corte, el Ecuador es el tercer exportador de rosas con una participación del 10 % a nivel mundial. La propagación tradicional de rosas, ha presentado limitaciones, dado que requiere mucho tiempo y por la diseminación de plagas y enfermedades; por ese motivo el cultivo *in vitro* ha resultado ser una alternativa para propagar y comercializar plantas sanas. En la presente investigación se propuso desarrollar un protocolo para la propagación *in vitro* de *Rosa chinensis*, mediante la evaluación de antimicrobianos en la fase de introducción, valoración de medios de cultivo, posición del explante y sustratos, en las fases de organogénesis y adaptación al sustrato. En la fase de introducción, el tratamiento T3 (100 mg/L Metilparabeno), presentó el mayor porcentaje de brotación (80 %) y longitud promedio (1,3 cm); y, menor contaminación (bacteriana y fúngica) y fenolización; en la fase de organogénesis todos los tratamientos favorecieron la brotación, la interacción S2P2 (½ MS; 45 °) presentó el 100 % de rizogénesis, S2 (½ MS) produjo el mayor porcentaje de callogénesis (33 %) y S1P1 (¼ MS; 90 °) generó la mayor longitud promedio (2,77 cm); por último, en la fase de adaptación al sustrato, se determinó que el tratamiento T1 (Turba) favoreció la adaptación de las plántulas presentando un 100 % de sobrevivencia y enraizamiento, y una altura promedio de 3,48 cm.

Palabras clave: Metilparabeno, tetraciclina, organogénesis, posición del explante

Abstract

The rose is one of the most cultivated and sought-after species as a cut flower, Ecuador is the third largest exporter of roses with a participation of 10 % worldwide. The traditional propagation of roses has presented limitations, since it requires a lot of time and because of the spread of pests and diseases; for this reason, *in vitro* culture has proven to be an alternative to propagate and commercialize healthy plants. In the present investigation, it was proposed to develop a protocol for the *in vitro* propagation of *Rosa chinensis*, by evaluating antimicrobials in the initiation stage, assessment of culture media, position of the explant and substrates, in the phases of stage of organogenesis and acclimatization. In the initiation stage, treatment T3 (100 mg/L Methylparaben), presented the highest percentage of sprouting (80 %) and average length (1,3 cm), and less contamination (bacterial and fungal) and phenolization; in the stage of organogenesis, all treatments favored sprouting, the interaction S2P2 ($\frac{1}{2}$ MS; 45 °) presented 100 % rhizogenesis, S2 ($\frac{1}{2}$ MS) produced the highest percentage of callogenesis (33 %) and S1P1 ($\frac{1}{4}$ MS; 90 °) obtained the highest average length (2,77 cm); finally, in the acclimatization it was determined that the T1 (peat) treatment favored the adaptation of the seedlings, presenting 100 % survival and rooting, and an average height of 3,48 cm.

Keywords: Methylparaben, tetracycline, organogenesis, explant position.

Introducción

La rosa es una de las plantas ornamentales más cotizadas como flor de corte (Qi et al., 2018), es una de las especies más vendidas dentro del comercio internacional de flores (Henuka et al., 2015). Debido a las condiciones climáticas y bajo costo de producción, las regiones tropicales de América Latina y África se han convertido en áreas ideales para la producción de rosas (Liu et al., 2019); en Ecuador, la producción de rosas inició a principio de los 80's, alcanzando rápidamente un alto prestigio y reconocimiento en el mercado internacional (Sozoranga & Vélez, 2016), actualmente en el país, el sector florícola se encuentra en tercer lugar de las exportaciones totales del país, con una participación del 4 % (Sozoranga & Vélez, 2016; Zabala, 2019). En su informe Expoflores (2019), menciona que cerca del 80 % de exportación de rosas se realiza a la Unión Europea, Estados Unidos, Rusia y Canadá; en el 2019, las rosas representaron el 74 % del total exportado.

En condiciones *ex vitro* las rosas se puede propagar de diferentes maneras mediante injertos, esquejes, semilla y acodo, siendo estas dos últimas técnicas las menos empleadas, ya que la mayoría de rosas con fines comerciales se cultivan mediante injertos; sin embargo, al realizar estos tipos de propagación tradicional se tiene algunas limitaciones tales como condiciones climáticas adversas, alta inversión, bajas tasas de multiplicación (Yong, 2004), y diseminación de plagas y enfermedades (Buczacki, 1997), que pueden ser causadas por ácaros, pulgones, trips, nematodos (*Meloidogyne* y *Xiphinema*), hongos (*Oidium leucoconium*, *Diplocarpon rosae*), bacterias (*Agrobacterium tumefaciens*) y virus (*Rose mosaic virus*, *Arabid mosaic virus*) (Youren, Jingyang, Baosheng, & Penghua, 2015).

La mayoría de las plantas se encuentran colonizadas por distintas bacterias endofíticas que, al distribuirse por diferentes compartimentos de la planta, en condiciones de campo les permiten tolerar condiciones de estrés (El-Deeb, Bazaid, Gherbawy, & Elhariry, 2012), pero en condiciones *in vitro*, pueden permanecer latentes en el interior de los tejidos (Limsuwan et al.,

2009; Pérez & Chamorro, 2013), por la alta concentración de sales, azúcares o pH en el medio (Barrett & Cassells, 1994). En el cultivo de rosas, la información sobre la relación entre las plantas y bacterias endofíticas es escasa (El-Deeb, Bazaid, Gherbawy, & Elhariry, 2012); sin embargo, Carrazana et al. (2003), mencionan que en cultivos leñosos como la rosa, se pueden encontrar contaminantes endógenos que pueden inhibir su crecimiento, debido a que pueden estar latentes y activarse cuando las condiciones ambientales sean favorables.

Para solucionar las limitaciones mencionadas en los últimos años, las técnicas que más se han usado para la micropropagación de Rosas, a partir de órganos y tejidos vegetales, son el cultivo de brotes, yemas, y callos; a diferencia del cultivo de embriones y protoplastos que son métodos poco utilizados debido a su alto grado de dificultad (Castilla, 2005). La propagación *in vitro* de rosas, ha resultado ser una gran alternativa para propagar de manera masiva plantas genéticamente idénticas, y libres de plagas y enfermedades (Leiva-Mora, 2006).

A pesar de que existen protocolos establecidos para diferentes variedades de rosas, en el caso de *Rosa chinensis*, la cantidad de ensayos publicados es limitado. Por lo tanto, para cada fase es necesario establecer los diferentes factores apropiados para la propagación *in vitro* de este cultivar con características exportables. Por lo anteriormente mencionado, la presente investigación tuvo como objetivo desarrollar un protocolo para la propagación *in vitro* de *Rosa chinensis*, mediante la evaluación de antimicrobianos durante la fase de introducción, para la obtención de plántulas libres de patógenos en un corto tiempo; y, valoración de medios de cultivo, posición del explante y sustratos, durante las fases de organogénesis y adaptación al sustrato, para la regeneración, multiplicación y establecimiento de vitroplantas de *R. chinensis*, bajo la hipótesis de que los protocolos evaluados en las fases de introducción, organogénesis y adaptación, permiten el establecimiento *in vitro* de *Rosa chinensis*.

Capítulo 1

1 Marco Teórico

1.1 *Rosa chinensis*

El género *Rosa* abarca cerca de 200 especies, y como producto de los diferentes cruces se han encontrado cerca de 30 mil variedades. Sin embargo, debido a la existencia de poblaciones híbridas silvestres, la cantidad real aún es desconocida (Larson, 2013, pág. 83). Dentro de esta gran cantidad de variedades se encuentra *Rosa chinensis*, que se cultiva y se vende en todo el mundo como flores de corte o plantas de jardín (Liu et al., 2019). Sus flores presentan varios usos medicinales, ornamentales y gastronómicos (Pressi et al., 2019).

1.1.1 Distribución

El género *Rosa*, es endémico de las zonas templadas y subtropicales del hemisferio norte incluyendo a Europa, Asia y Medio Oriente (Arzate-Fernández, Bautista-Puga, Piña-Escutia, Reyes-Díaz, & Vázquez-García, 2014); pero gracias a los hispanos y sajones, el cultivo de las rosas se ha podido expandir y hoy en día son cultivadas y comercializadas en varios países de América (Yong, 2004).

Específicamente *Rosa chinensis*, es una especie nativa de suroeste de China, provincia de Szechua, donde se ha evidenciado el crecimiento de este rosal de manera silvestre (Clay & Hubbard, 1977, pág. 30; Pressi et al., 2019), pero debido a las condiciones climáticas y bajo costo de producción, las regiones tropicales de América Latina y África son áreas ideales para la producción de rosas (Liu et al., 2019).

En la actualidad los países que representan el 76 % de exportaciones de flores a nivel mundial, principalmente de rosa como flor de corte, son: Holanda que ocupa el primer lugar, con una exportación del 50 %, seguido de Colombia con 16 % y en tercer lugar Ecuador con 10 % (Expoflores, 2019), sin embargo, debido a que el sector florícola, ha crecido en los últimos

años, países como México y Costa Rica se han destacado como productores y exportadores de flores (Túquerres, 2019).

En Ecuador, las empresas productoras de rosas se concentran en la Sierra, en provincias como Pichincha (77 %), Cotopaxi (12 %), Imbabura (4 %), Azuay (2 %) y otros (5 %) (Corporación Financiera Nacional, 2017). En el país, las flores son uno de los productos no tradicionales, que representan el 4 % de las exportaciones (Zabala, 2019), según el informe presentado por Expoflores (2019), el 45,3 % de las exportaciones de rosas, tuvo como destino principal Estados Unidos, seguido de la Unión Europea con 20,2 %, Rusia 14,7 %, Canadá 2,5 %, Ucrania 2,4 %, Kazajistán 2,3 %, Chile y China 1,4 % y Japón 1,1 %, mientras que el 8,7 % restante lo abarcaron los demás mercados.

Respecto al incremento del mercado de flores, durante el 2018 y 2019, Canadá mantuvo su participación, Estados Unidos, Ucrania, Kazajistán y otros, incrementaron su participación con 3,9 %; 1,0 %; 0,2 % y 1,7 % respectivamente, mientras que países de la Unión Europea, Rusia, Chile, China y Japón, presentaron un decrecimiento de 1,8 %; 4,1 %; 0,5 %; 0,4 % y 0,1 %, respectivamente (Expoflores, 2019).

1.1.2 Taxonomía

La rosa es una planta ornamental que pertenece a la familia Rosaceae (Álvarez, 1980 citado en Yong, 2004).

La clasificación taxonómica de *Rosa chinensis*, según López (2015, pág. 114), es la siguiente:

Reino: *Plantae*

Orden: *Rosales*

Familia: *Rosaceae*

Género: *Rosa*

Especie: *Rosa chinensis*

1.1.3 Descripción

Rosa chinensis es una planta arbustiva que puede medir entre 1 y 2 m de altura, sus tallos son semileñosos con espinas, sus hojas son compuestas, imparipinadas y de color verde y su sistema radicular es vigoroso (Yong, 2004; Arzate-Fernández et al., 2014). Sus flores son completas, en racimos y con una amplia gama de colores (blanco, amarillo, morado y rosado), su floración es continua y su fruto se encuentra encerrado en un receptáculo carnoso (Buczacki, 1997, pág. 60).

1.1.4 Plagas y enfermedades

El cultivo de rosas, puede ser expuesto a plagas y enfermedades como consecuencia de malas prácticas agrícolas. Entre las principales plagas se encuentran los ácaros que causan zonas cloróticas en las hojas, pulgones que provocan hojas deformes y descoloridas por succión de la savia (Sinha, 2017), trips que se alimentan de diferentes partes de la planta, causando deformación en flores y hojas (Sathyan, Dhanya, Preethy, Aswathy, & Murugan, 2017) y nematodos (*Meloidogyne*, *Rotylenchulus* y *Xiphinema*) que atacan las raíces dificultando el transporte y absorción de nutrientes y formando agallas (Ei-Deen, Hadeer, El-Ghamdi, & Samra, 2015).

Como enfermedades principales del cultivo de rosa, ocasionadas por hongos está botrytis (*Botrytis cinerea*), que causa necrosis en las partes aéreas de las plantas, roya (*Phragmidium mucronatum*) que provoca clorosis en las hojas por la acumulación de esporas en el envés de la hoja, y la mancha negra (*Diplocarpon rosae*) que genera manchas oscuras sobre las hojas (Sinha, 2017).

En las especies vegetales en condiciones de campo, la presencia de microorganismos puede resultar beneficiosa, dado que les permiten resistir al estrés biótico y abiótico, incrementar el crecimiento y desarrollo vegetal al mejorar su nutrición, actuar como biocontroladores, fijar el

nitrógeno, solubilizar el fósforo entre otras, pero en ocasiones pueden actuar como patógenos causando la muerte de las plantas debido a que compiten por el espacio y nutrientes (Cano, 2011; Orlikowska, Nowak, & Reed, 2017). En el cultivo de *Rosa damascena* trigintipeta, El-Deeb, Bazaid, Gherbawy, & Elhariry (2012), caracterizaron bacterias endofíticas (*Planococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Methylococcus*, *Acinetobacter* y *Acetobacter*) capaces de interactuar con la planta por medio de la producción de fitohormonas (IAA), enzimas hidrolíticas y sideróforos, entre otros.

En condiciones *in vitro*, los vitropatógenos pueden resultar nocivos, ya que su proliferación incrementa al disponer de una óptima concentración de nutrientes en el medio de cultivo (Lumsden, Pryce, & Leifert, 1990); en algunos casos, la contaminación no siempre es visible en las etapas iniciales del cultivo por el alto contenido de sales o sacarosa y variación de pH (Falkiner, 1997), pero su tasa de multiplicación puede incrementar a medida que se realicen subcultivos (Reed, Mentzer, Tanprasert, & Yu, 1998). Las pérdidas del material vegetal *in vitro* pueden ser del 10 – 35 % por la presencia de hongos y levaduras, y del 20 – 55 % por bacterias (Leifert, Morris, & Waites, 1994).

1.1.5 Propagación

Las rosas se pueden propagar de manera sexual y asexual; la primera implica la fusión de gametos haploides (fecundación) y se produce a gran escala, y la segunda puede realizarse por injertos, brotes o esquejes enraizados (Yong, 2004), no obstante, estas técnicas pueden presentar algunas limitaciones, ya que son costosas, requieren de tiempo y trabajo, su producción es lenta y puede ocurrir la diseminación de plagas y enfermedades (Kumud, Hem, & Vijay, 2015).

Las dificultades que presentan ambas propagaciones, están siendo solucionadas a través del cultivo de tejidos vegetales con el fin de propagar de forma masiva plántulas genéticamente

idénticas y mejoradas, libres de plagas y enfermedades en un espacio reducido y en menor tiempo (Sharry, Adema, & Abedini, 2015).

1.1.6 Antecedentes del cultivo *in vitro* de *Rosa chinensis*

A pesar de existir limitados estudios sobre la micropropagación *in vitro* de esta especie, en los últimos años se han reportado algunos ensayos. Sun et al. (2013), lograron obtener plántulas sanas de *Rosa chinensis* “Xiangbin”, a partir de nódulos de tallo, sembrados en un medio basal MS suplementado con 1,0 mg/L de 6-BA y 0,2 mg/L de IBA; y, 80 % de enraizamiento en un medio MS al 50 % con 0,3 mg/L de NAA; Diniz, Almeida, Oliveira, & Vidal (2014), obtuvieron 5 brotes/explante, en medio MS con 1,0 mg/L de BAP, y el 100 % de las plántulas enraizaron utilizando sales MS al 100 %, sin la adición de fitohormonas.

Tho et al. (2018), sembraron segmentos de tallos de *Rosa chinensis* Jacq. var. mínima Redh, en medio MS con 2 mg/L de BA; 0,5 mg/L de Kinetina; 0,5 g/L de carbón activado y 30 g/L de sacarosa, logrando una tasa de brotación del 100 % y 3,6 brotes/explante con una longitud promedio de 2,2 cm. En el estudio realizado por Tibkwang, Junkasiraporn, & Chotikadachanarong (2018), indican la posibilidad de obtener un mayor número de brotes/explante (2,73 – 2,77), sembrando segmentos nodales de *Rosa chinensis* Jacq. var. mínima Voss, en medio basal MS con 1,5 mg/L de TDZ y 40 g/L de sucrosa. Actualmente no hay reportes sobre la inducción de organogénesis *in vitro* en rosas sin la adición de reguladores de crecimiento.

Reed, Mentzer, Tanprasert, & Yu (1998), señalan que el establecimiento *in vitro* de especies leñosas como las rosas, pueden resultar susceptibles a infecciones causadas por la repentina aparición de bacterias endofíticas, las cuales, al distribirse por todos los tejidos vegetales mediante los haces vasculares, pueden establecerse durante un largo tiempo en el interior de los órganos manifestando diferentes factores de patogenicidad, evitando los mecanismos de

defensa de las plantas y afectando su crecimiento y desarrollo (Fletcher & Wayadande, 2009). Por ese motivo Young, Hutchins, & Canfield (1984), incubaron brotes contaminados de roble y manzano en un medio líquido con la siguiente combinación de antibióticos: 25 mg/L de cefotaxima + 25 mg/L de tetraciclina + 6 mg/L de rifampicina + 6 mg/L de polimixina B, logrando eliminar las bacterias en su totalidad; Salehi & Khosh-Khui (1997), evaluaron diferentes soluciones de antibióticos (ampicilina, tetraciclina, gentamicina y amoxicilina) en segmentos nodales de rosa miniatura “Baby masquerade” para eliminar la contaminación endógena presente en la especie; únicamente el 20 % de los explantes se descontaminaron con 10 mg/L de gentamicina y tetraciclina antes de realizar la esterilización superficial de los explantes; pero el mayor porcentaje de descontaminación (>50 %), se obtuvo después de la esterilización superficial, al aplicar 100 mg/L de cada antibiótico por 30 min.

1.2 Cultivo *in vitro* y morfogénesis

1.2.1 Generalidades

El cultivo *in vitro* se ha desarrollado debido a la totipotencia celular, que permite el desarrollo de una planta completa a partir de células vegetales simples. Esta técnica se basa en el cultivo de tejidos, órganos o células vegetales, en medios nutritivos adecuados, bajo condiciones asépticas y en ausencia de microorganismos, permitiendo el desarrollo de plantas enteras a partir de explantes (Acosta, 2015; Cortes, Pérez, & Mora, 2017).

El cultivo de tejidos vegetales, es un soporte para los métodos de propagación tradicionales, dado que permite la masificación y preservación de especies que se encuentran en peligro de extinción o que presentan una carga genética importante (George, Hall, & De Klerk, 2008; Martínez-Villegas et al., 2015).

1.2.2 Morfogénesis

La morfogénesis es la formación de órganos y comprende procesos de desdiferenciación celular y rediferenciación, bajo determinados estímulos, para obtener diferentes respuestas como la regeneración de brotes, primordios de raíces, callos, entre otros (Pérez-Bernal, Delgado, Hernández, & Armas, 2008).

La respuesta morfogénica puede variar según el tipo de material vegetal, composición del medio y adición de reguladores de crecimiento debido a su relación directa con el explante (De Menezes et al., 2016). Según Prieto, Jordan, Barrueto, Rocha, & Durzan (2005), las condiciones endógenas del medio, deben permitir que los diferentes tejidos expresen distintas respuestas como organogénesis radicular, caulinar y embriogénesis; tanto directa como indirecta.

1.2.2.1 Caulogénesis

La caulogénesis, es un tipo de morfogénesis que comprende la formación de un brote adventicio, el cual puede originarse según los niveles de hormonas que estén presentes en el explante y/o medio de cultivo, una alta concentración de citoquininas y baja concentración de auxinas, permite la generación de brotes (Moreno, Pérez, Moreno, & Moreno, 2019).

Durante el proceso caulogénico se ha diferenciado tres fases: la primera es la adquisición de competencia morfogénica, marcada por un proceso de desdiferenciación o transdiferenciación celular, la segunda fase implica un proceso de estimulación de los meristemas apicales, por efecto de la presencia de reguladores de crecimiento en el cultivo, y la última fase comprende el desarrollo de brotes (Alvarez, Bueno, Cuesta, Feito, & Ordás, 2020).

El desarrollo caulogénico, puede ser directo e indirecto, la vía directa, consiste en la formación de brotes a partir de meristemas caulinares y elongación del tallo sin la formación de células

callosas, mientras que la vía indirecta, implica el cultivo de callos para el desarrollo de brotes (Suárez, 2020).

1.2.2.2 Rizogénesis

La rizogénesis es una respuesta morfogénica que se basa en la generación de raíces adventicias a partir de un vástago, la interacción entre auxinas y citoquininas en baja concentración, promueve la formación polar de la raíz en la zona basal del vástago (George, Hall, & De Klerk, 2008; Jofré, Ríos, Becerra, & Sánchez, 2016).

El proceso rizogénico, consiste en la formación de primordios radicales en la parte basal del explante, como resultado de la formación de meristemoides que presentan un grado de polaridad. Una vez formado el primordio radical, comienza el desarrollo de tejidos parenquimáticos y vasculares, desencadenando la formación y desarrollo del tejido rizogénico. Esta respuesta morfogénica puede ser inducida, mediante las células diferenciadas del tallo o previo a la formación de callo (Pérez, 2006).

1.2.2.3 Callogénesis

Según Pérez (2006), un callo está compuesto por células meristemáticas y somáticas unidas a células parenquimáticas con grandes vacuolas, dichos tejidos generan nódulos, permitiendo que las células se dividan constantemente y aumenten su tamaño.

La respuesta callogenética consiste en un proceso de dediferenciación y proliferación de células somáticas, este proceso es inducido por la presencia de minerales, sacarosa y otros nutrientes orgánicos, en la mayoría de explantes es necesario el empleo exógeno de reguladores de crecimiento. La presencia de auxina en el medio de cultivo, favorece la respuesta callogenética, sin embargo, concentraciones en iguales cantidades de auxinas y citoquinas aumentan el porcentaje callogenético (L'bachir El Kbiach et al., 2017).

1.2.3 Medio de cultivo

Un medio de cultivo es la formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos necesarios para la nutrición de los tejidos vegetales (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010).

Según Indacochea, Julio, & Parrales (2017, pág. 17), para asegurar la proliferación del tejido vegetal, se puede utilizar un medio basal, y dependiendo de la respuesta que se quiera inducir, se puede adicionar diferentes componentes y reguladores de crecimiento. Según De Menezes et al. (2016), para garantizar la disponibilidad de nutrientes a los tejidos vegetales, el medio de cultivo puede estar compuesto por macro y micronutrientes, aminoácidos, vitaminas, agentes gelificantes, fuente de carbono y agua pura libre de iones. A continuación, se detalla cada uno de los componentes del medio.

1.2.3.1 Sales inorgánicas

Las sales inorgánicas son muy utilizadas en cultivos *in vitro*, dado que influyen en el crecimiento y desarrollo de los tejidos y células vegetales, por esta razón, las sales en fases de introducción y multiplicación han favorecido el crecimiento y proliferación de brotes en rosas (Castilla, 2005). Sin embargo, en ocasiones es necesario modificar el contenido vitamínico y reducir la concentración de sales, para evitar efectos negativos en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Jiménez-Mariña, Silva-Pupo, Borges-García, & Fonseca-Arias, 2016).

Pérez (2006), menciona que los macronutrientes son elementos minerales que los tejidos vegetales requieren en cantidades mayores, mientras que los micronutrientes son requeridos en cantidades menores, para evitar un efecto tóxico en elevadas cantidades. Al respecto Martínez-Villegas et al. (2015), señalan que el medio nutritivo más utilizado para iniciar el cultivo, multiplicar y enraizar tejidos vegetales es Murashige y Skoog (MS), debido a su contenido de macronutrientes y micronutrientes, con el fin de estimular una respuesta morfogénica *in vitro*

(Murashige & Skoog, 1962), la concentración de sales en el medio puede variar, al reducir su concentración a la mitad o a un cuarto de lo normal, la oxidación fenólica disminuye y se activa una respuesta rizogénica (Canli & Kazaz, 2009), mientras que altas concentraciones de sales (>50 %), pueden afectar el crecimiento y desarrollo del tejido vegetal (Bahmani, et al., 2012). Araruna et al. (2017), comparten que las concentraciones de sales juegan un papel fundamental en las rutas metabólicas ya que al activarlas o desactivarlas, pueden favorecer o inhibir el desarrollo de explantes o provocar la muerte de los tejidos vegetales.

1.2.3.2 Fuente de carbono

Los tejidos vegetales *in vitro*, necesitan un aporte exógeno de carbohidratos que les proporcione la energía necesaria, ya que carecen de actividad fotosintética (Leifert, Murphy, & Lumsden, 1995; Tacoronte, Vielma, Olivo, & Chacín, 2017). La sacarosa es la fuente de carbono más utilizada, ya que induce el crecimiento celular, formando plántulas con mayor altura, diámetro y número de hojas. Por lo general se utiliza en concentraciones entre 1 – 5 %, para inducir una respuesta morfogénica (Martin, 2017; Cuchut & Murillo, 2019).

Según Reyes-Díaz, Arzate-Fernández, & Piña-Escutia (2018), concentraciones mayores al 5 %, favorece la inducción de embriones somáticos, mientras que concentraciones al 1 %, permiten que se formen tallos con un mayor diámetro y vigor, cuando el explante inicial son yemas. Pero como alternativa también se pueden utilizar otras fuentes energéticas como glucosa, fructosa, maltosa, galactosa y myo-inositol (Martin, 2017; Cuchut & Murillo, 2019).

1.2.3.3 Vitaminas y aminoácidos

El crecimiento y la morfogénesis en cultivos de tejidos vegetales, pueden ser inducidos por la adición de suplementos externos como vitaminas y aminoácidos. Las vitaminas más usadas en el cultivo *in vitro* son la tiamina, myo-inositol, ácido nicotínico, vitamina C y D₃, entre otras (Abrahamian & Kantharajah, 2011).

Las vitaminas son complejos esenciales para el correcto desarrollo celular del tejido vegetal, por lo general las plantas sintetizan una mayor cantidad de vitaminas, debido a que las utilizan para el crecimiento y diferenciación celular, cumpliendo un rol catalítico; cuando los tejidos vegetales son cultivados bajo condiciones *in vitro*, la ausencia de vitaminas puede ser un factor limitante en su desarrollo (Sharry, Adema, & Abedini, 2015).

Las células vegetales metabolizan los aminoácidos como una fuente de nitrógeno, para obtener energía y favorecer el crecimiento y desarrollo vegetal (Reyes-Díaz, Arzate-Fernández, & Piña-Escutia, 2018), los aminoácidos más usados son la L-glicina, L-glutamina, L-prolina, L-lisina, L-cisteína, ácido glutámico, entre otros (Sharry, Adema, & Abedini, 2015).

1.2.3.4 Agentes solidificantes

El medio de cultivo que se utiliza para la propagación de plántulas *in vitro*, puede estar en fase líquida (sin agente gelificante) o en fase semisólida con un agente solidificante, este último permite una posición fija del explante. El agar en concentraciones entre 0,3 – 1 %, es uno de los agentes solidificantes de mayor uso, debido a que posee una mayor inocuidad sobre los tejidos vegetales (Romay, Matehus, Gerstl, Rueda, & Santana, 2006). Moreno, Moreno, Ruffo, & Gómez-Kosky (2001), mencionan que, al adicionar bajas concentraciones de agar, existe menor retención de los componentes del medio de cultivo, lo que favorece a la absorción de nutrientes en los explantes vegetales.

El agar es un polisacárido de galactosa y galactomanano, proveniente de las algas rojas, su composición es 70 % agarosa y 30 % agarpectina, se solubiliza en agua hirviendo y se gelifica a 45 °C; su uso se debe a que puede formar geles estables y resistentes a la acción enzimática bacteriana (Sharry, Adema, & Abedini, 2015). Es estable a las temperaturas de esterilización, ya que no cambia su estructura, no provoca una reacción adversa con los componentes del medio de cultivo y no interfiere en su movilización (Martín, Cárdenas, & Cárdenas, 2013).

1.2.3.5 Antimicrobianos

Los antimicrobianos son agentes que se caracterizan por destruir o inhibir el desarrollo y multiplicación de microorganismos, debido a que presentan un efecto bacteriostático y/o fungistático (Singh, 2018). Entre los mecanismos de acción que presentan, están: inhibición de la biosíntesis de ácidos nucleicos, afectación a las membranas e interrupción de procesos metabólicos (Rodríguez, 2011). Debido a que los contaminantes microbianos, son uno de los causantes de pérdidas en la propagación vegetativa *in vitro*, se ha optado por incorporar antimicrobianos en el medio de cultivo; al respecto Abreu, Castillo, Sol & González (2016), mencionan que es importante considerar su concentración, para evitar efectos fitotóxicos sobre los tejidos vegetales.

Entre los antimicrobianos se encuentran: antivirales, antimicobacterianos, antirretrovirales, antiparasitarios, antibacterianos como las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, tetraciclinas, sulfonamidas, glucopéptidos, entre otros (Girón, 2008), y antimicóticos como polienos, azoles, alilaminas, lipopéptidos, pirimidinas y otros (Allevato, Negroni, & Galimberti, 2007).

Las tetraciclinas son usadas como antimicrobianos, debido a que presentan un mecanismo de acción bacteriostático sobre los bacilos Gram negativos, fijándose en la subunidad 30s, impidiendo el ensamblaje de los péptidos y causando la muerte celular bacteriana (Morejón, Salup, & Cué, 2003); no obstante, en los últimos años, su espectro ha disminuido como consecuencia de un elevado nivel de resistencia bacteriana (Fernández-Cuenca et al., 2006). Ligos, Turrientes, & Cisneros (2009), reportan que una concentración de 30 mg/L de tetraciclina en el medio, resulta ser la más adecuada para eliminar contaminantes endógenos en los explantes e influir lo menos posible en el desarrollo morfogenético de los explantes.

Los parabenos, también son uno de los compuestos antimicrobianos más utilizados, por su efecto contra hongos, levaduras y bacterias (Gram positivas), acción en medios neutros, bajo costo de producción (Weber, 2005) y por no inducir resistencia en los microorganismos (Nes & Eklund, 1983). Los parabenos que más se utilizan son: metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno y butilparabeno. El metilparabeno es un compuesto muy usado como conservante en la industria por su actividad antioxidante al capturar los radicales libres que causan alteraciones a nivel celular (Galeano, Rodríguez, Correa, & Caicedo, 1981), amplio espectro antimicrobiano (Ley, Mendaza, & Gómez, 2006), baja toxicidad, resistencia a altas temperaturas y esterilización en autoclave, y estabilidad en un rango de pH de 4,5 a 7,5 (Madox, 1982 citado en Soni, Carabin, & Burdock, 2005). Aunque no existe una concentración óptima para su uso en el cultivo *in vitro*, Galeano, Rodríguez, Correa, & Caicedo (1981), recomienda usarlo en bajas concentraciones, con el fin de evitar efectos fitotóxicos.

1.2.4 Condiciones ambientales

En la micropropagación *in vitro*, el crecimiento vegetal se puede ver influenciado por varios factores abióticos, como la temperatura, humedad y luz.

Una humedad relativa alta, debido a que los recipientes tienen una baja tasa de intercambio gaseoso, los tejidos vegetales pueden presentar alteraciones foliares e hiperhidricidad, para evitar estos problemas, se recomienda valores entre 50 – 60 % (Pérez, 2006).

Otro factor a considerar es la luz, la cual interviene en el desarrollo y crecimiento vegetal de los organismos autótrofos. Según Murillo-Talavera et al. (2016), es importante considerar aspectos como el fotoperíodo, la intensidad y duración de la luz, dado que permiten la activación de varias respuestas fisiológicas, los autores recomiendan una longitud de onda de 400 – 700 nm y un fotoperíodo 16/8 (horas luz/oscuridad).

Por último, la temperatura, es un factor que puede variar según la especie vegetal, en especies tropicales, el rango promedio de temperatura es de 28 ± 1 °C y en especies de clima frío, el rango promedio es de 5 ± 1 °C; sin embargo, la mayoría se desarrollan en un rango promedio de temperatura de 24 ± 1 °C, ya que favorece desenvolvimiento vegetal (García et al., 2004).

Para el crecimiento y desarrollo de los explantes se recomienda incubar bajo condiciones controladas, con una temperatura de 24 ± 1 °C, iluminación entre 1000 – 3000 lux, fotoperíodo de 16/8 horas de luz y oscuridad y humedad relativa entre 70 – 80 %, con el fin de evitar la presencia de contaminantes biológicos (hongos, virus y bacterias) (Paz, 2000). Por lo mencionado se recomienda usar un climatizador.

1.2.4.1 Cámara de clima constante (climatizador)

La cámara de clima constante, produce energía térmica (frío/calor) y posee 3 filtros, dos situados en el equipo y uno ubicado en los terminales de los difusores, estos filtros aseguran la eliminación de partículas que se encuentran en estado de suspensión y microorganismos, generan una atmósfera estéril, y permiten mantener las condiciones controladas (MEMMERT, 2019).

1.2.5 Fases del cultivo *in vitro*

1.2.5.1 Fase 0: selección de la planta madre

Etapa inicial que comprende la selección de plantas donadoras, para poder establecer el cultivo de manera aséptica, es importante que la planta madre presente un buen nivel nutricional, un desarrollo adecuado y que se mantenga en un invernadero bajo condiciones sanitarias óptimas (Roca & Mroginski, 1993, pág. 113). Al momento de seleccionar la planta donadora, existen factores que se deben considerar, como su edad y fisiología, estado en el que se recolecta, tamaño y calidad sanitaria (Levitus et al., 2010). El estado fisiológico de la planta donadora es

importante debido a que influye en su respuesta morfogénica, para asegurar una propagación *in vitro* a gran escala libre de enfermedades, se puede optar por órganos vegetales jóvenes y con menor diferenciación, ya que presentan una mejor respuesta *in vitro* en la fase de establecimiento (Roca & Mroginski, 1993, pág. 131; Guerrero, Gómez-Kosky, & Bermúdez-Carballoso, 2016).

1.2.5.2 Fase I: introducción al medio

Esta fase implica la selección del explante, protocolo de desinfección y establecimiento en el medio de iniciación (Montilla de Bravo et al., 1997). Es importante tener una total asepsia, para lograr la inducción morfogénica del material vegetal en condiciones *in vitro* (Prieto et al., 2005, pág. 55).

Al momento de seleccionar los explantes, según El Boullani, Lagram, El Mousadik, & Serghini (2017), es importante considerar su tamaño, ya que puede influenciar la proliferación de yemas en el medio. Si bien un explante de mayor tamaño permite el crecimiento, regeneración de órganos y proliferación de callos, las posibilidades de contaminación también aumentan; con el fin de disminuir la contaminación se pueden usar explantes pequeños, considerando que su establecimiento puede resultar complicado, ya que pueden presentar un bajo crecimiento y requerir de medios más complejos (Indacochea, Julio, & Parrales, 2017).

Una vez seleccionado el explante, se realiza un protocolo de desinfección, utilizando diferentes compuestos como hipoclorito de sodio o calcio, alcohol, Tween 20, peróxido de hidrógeno, entre otros (Montilla de Bravo et al., 1997; George, Hall, & De Klerk, 2008). La concentración y tiempo de exposición de los reactivos, será en función del tipo de órgano vegetal, para evitar que las células se dañen e interfieran con las respuestas morfogénicas (Prieto et al., 2005).

García-Luis, Bordón, Moreira-Dias, Molina, & Guardiola (1999), mencionana que al momento de sembrar los explantes, la polaridad y su posición en el medio, puede influir en la obtención

de una respuesta morfogenética. Según García, Araluce, Rubio, Rodríguez, & Feria (2004), los explantes pueden ser sembrados con la zona apical hacia arriba y la radical en dirección al medio (polar) o viceversa (apolar); respecto a la posición, los segmentos nodales pueden ser sembrados en posición vertical u horizontal (McClelland & Smith, 1990) para observar su influencia en la generación de brotes/explante y su longitud (Sutter & Barker, 1985). Al momento de realizar la siembra, es importante asegurarse de que el explante esté en contacto con el medio para evitar su deshidratación y favorecer su capacidad de regeneración (Sandoval, Brenes, & Pérez, 1991, pág. 9).

1.2.5.3 Fase II: multiplicación

En esta fase se busca que los explantes que consiguieron establecerse en la fase de inducción, produzcan brotes axilares o adventicios. En los segmentos nodales, dentro del peciolo de cada hoja se encuentra una yema, la cual se desarrollará en presencia de medio de cultivo, generando un nuevo vástago. Cada uno de los explantes generados se subcultivan constantemente en un nuevo medio de cultivo; a través de divisiones y resiembras se puede lograr un incremento exponencial (Parismoreno, Gordillo, & Santos, 2016).

Dado que el propósito de la fase de multiplicación, es producir un mayor número de yemas axilares o adventicias en un menor tiempo de producción, este procedimiento se debe realizar en equipos especiales como la cámara de flujo laminar y en lugares apartados, con el fin de poder mantener siempre las condiciones asépticas e incrementar el número de plantas en cada repique o división vegetal. La cantidad de explantes obtenidos en esta fase dependerá de la especie vegetal, las condiciones del medio de cultivo y la eliminación de los factores que retrasan el crecimiento vegetal (Indacochea, Julio, & Parrales, 2017).

1.2.5.4 Fase IV: enraizamiento

La fase de enraizamiento es un evento fisiológico importante en el cultivo *in vitro*, puesto que su presencia facilita la absorción de agua y nutrientes, y permite el posterior establecimiento de las vitroplantas a condiciones *ex vitro* (Fernández, Díaz, & González, 2016). En esta fase se da la formación de raíces a partir de los brotes obtenidos en la fase de multiplicación. Dependiendo del tipo de explante, esta fase se puede evitar, dado que en las fases iniciales la multiplicación y enraizamiento pueden ocurrir en conjunto (Indacochea, Julio, & Parrales, 2017).

Según Jofré et al. (2016), la adición de auxinas (AIA e IBA), compuestos fenólicos, diferentes fotoperíodos, entre otros, favorecen la inducción de raíces en los explantes, como estimuladores del enraizamiento; pero según Fernández et al. (2016), también se puede adicionar carbón activado, ya que favorece el desarrollo caulinar, foliar y radicular en los explantes.

1.2.5.5 Fase V: aclimatación

La aclimatación de los explantes es una etapa importante en la micropropagación, ya que puede presentar una elevada mortalidad de las vitroplantas, debido a que los explantes en la fase *in vitro* crecen con una humedad relativa alta, nutrición casi heterotrófica y bajo intercambio gaseoso, pueden presentar algunos cambios estructurales y fisiológicos, como baja eficiencia fotosintética, menor cantidad de ceras epicuticulares y alteración del funcionamiento estomático (Vargas-Castillo & Abdelnour-Esquivel, 2010). Para evitar las pérdidas se puede disminuir de manera gradual la humedad relativa en los recipientes, evitar la luz directa sobre las plantas y mantener una temperatura entre 13 y 30 °C, hasta llegar a las condiciones ambientales naturales (Majada, Sánchez-Tamés, & Sánchez-Moreiras, 2003; Pérez & Cornejo, 2014, pág. 29).

Majada et al. (2003), señalan que antes de trasplantar los explantes, se debe lavar las vitroplantas con agua templada, retirando residuos de agar que pueden servir como medio para

microorganismos patógenos, y sembrarlos en recipientes con sustrato estéril y aireado. Vargas-Castillo & Abdelnour-Esquivel (2010), indican que se pueden usar diferentes sustratos sueltos y porosos para permitir el desarrollo y crecimiento de las raíces, lo más usados son la turba, vermiculita, granza, tierra negra, entre otros. Para la aclimatación de rosas, Palacios-Arriaga & Rout (2019), recomienda usar diferentes sustratos formulados.

1.2.6 Problemas en el cultivo *in vitro*

1.2.6.1 Contaminación

El establecimiento de cultivos *in vitro*, puede verse limitado por la presencia de microorganismos contaminantes endógenos y exógenos. Su crecimiento se puede evidenciar en el medio de manera inmediata o pueden permanecer latentes en los tejidos vegetales (Hernández & González, 2010).

Las fuentes de contaminación que actúan como vehículos de los agentes contaminantes son el material vegetal, el aire, el medio y los operarios (Suárez, 2020, págs. 32-33). Los contaminantes microbianos más frecuentes en el cultivo *in vitro*, son hongos del género *Fusarium*, *Aspergillus* y *Alternaria*; y, bacterias del género *Enterobacter*, *Erwinia*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, entre otras (Singh, 2018). Sin embargo, las bacterias son uno de los contaminantes más comunes, difíciles de detectar y eliminar (Villa & Arbeláez, 2019).

Como alternativa para disminuir la incidencia de microorganismos contaminantes, se puede realizar pre tratamientos con productos químicos a la planta donadora, sumergir a los explantes en sustancias antibióticas o antimicóticas durante el proceso de desinfección, incubar los explantes por 24 horas en un medio básico (Indacochea, Julio, & Parrales, 2017), o adicionar antibióticos en el medio, como cloranfenicol y tetraciclina (bacteriostáticos) y penicilina, cefotaxima, ticar y rifampicina (bactericidas); es importante que su adición no varíe el pH del

medio, deben ser estables, de amplio espectro y no causar resistencia bacteriana (Abreu, Castillo, Sol, & González, 2016).

1.2.6.2 Fenolización

Durante el establecimiento *in vitro*, los explantes y el medio, pueden presentar oscurecimiento; cuando la célula vegetal, es sometida a estrés, presenta algún daño o se encuentra senescente, los niveles de las especies de oxígeno reactivo (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) aumentan y ocurre la liberación de enzimas oxidasas, denominadas polifenol oxidasas. Estas enzimas en conjunto con sus sustratos (tirosina o fenoles), liberan exudados tóxicos (quinonas), que provocan la muerte del explante, al inhibir su crecimiento (Azofeifa, 2009).

Algunos factores como la intensidad de luz, lesiones en el tejido vegetal, exposición prolongada a reactivos desinfectantes, entre otros, ocasionan que los explantes se oxiden de manera progresiva causando incluso su muerte (Méndez-Álvarez & Abdelnour-Esquivel, 2014). Para evitar o disminuir los problemas oxidativos, Azofeifa (2009), recomienda usar explantes jóvenes, disminuir la intensidad de la luz, mantener en oscuridad los medios de cultivo de 2 – 3 días antes de exponerlos a la luz, usar antioxidantes (ácido cítrico, ácido ascórbico y cisteína) en el protocolo de desinfección y/o medio de cultivo, adicionar carbón activado (2,0 y 3,0 g/L), sembrar en medio líquido, sustituir agentes desinfectantes, realizar subcultivos y reducir a la mitad la concentración de sales.

Capítulo 2

2 Metodología

2.1 Localización del ensayo

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, ubicada en la parroquia El Girón, cantón Quito, provincia de Pichincha.

2.2 Selección, colecta y transporte del material vegetal

Las plantas donadoras de *Rosa chinensis* (Figura 1) se adquirieron en la provincia de Pichincha, cantón Quito, parroquia Ponciano.



Figura 1. Planta donadora de *R. chinensis*.
Elaborado por: Los autores, 2020.

Para la selección se consideró la edad del explante, entre 3 y 6 meses, para reducir la presencia de fenoles al momento del corte y siembra, se verificó que las plantas estén visualmente sanas y que presenten un mayor número de yemas.

Se realizó un pretratamiento a las varetas con la aplicación de un fungicida de contacto (Chlorothalonil) por 12 horas, luego se envolvió en papel periódico húmedo y se las colocó en fundas plásticas para trasportarlas hacia el laboratorio.

2.3 Fase I: Desinfección de los explantes y evaluación de antimicrobianos

2.3.1 Protocolo de desinfección

Realizado el pretratamiento a las varetas, se cortó en segmentos nodales de un tamaño promedio de 5 cm (Figura 2a) y se sumergieron en cinco soluciones diferentes (Tabla 1, Figura 2b). Después de cada inmersión, los explantes fueron lavados tres veces con agua destilada estéril.

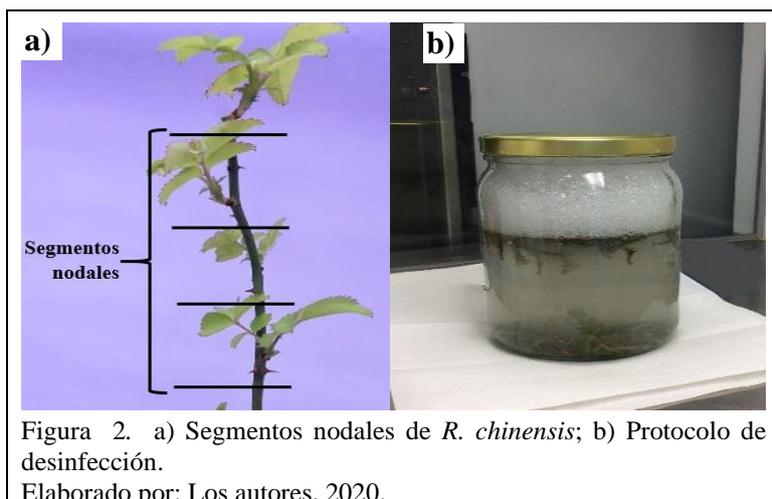


Tabla 1.

Protocolo de desinfección aplicado a explantes de *R. chinensis*, en la fase de introducción.

Solución desinfectante	Concentración	Tiempo de inmersión
Agua + jabón	1 % v/v	3 min
NaClO	3 % v/v	1 min
Alcohol	80 % v/v	1 min
Fungicida (sulfato de cobre pentahidratado)	0,1 % v/v	40 seg
Ácido cítrico	0,05 % p/v	1 min

Elaborado por: Los autores, 2020.

2.3.2 Medio de introducción

El medio de cultivo empleado para la fase de introducción, fue MS al 100% (Anexo 1), suplementado con sacarosa, carbón activado, ácido cítrico y pH ajustado a 5,8; en el ensayo se

evaluaron diferentes antimicrobianos adicionados al medio de cultivo (Tabla 2). Los explantes cultivados se colocaron en un climatizador, bajo condiciones controladas con una temperatura 24 ± 2 °C, humedad relativa entre 70 – 80 % y fotoperíodo 16/8.

Tabla 2.

Antimicrobianos utilizados para la inducción de brotes en *Rosa chinensis* al medio de cultivo.

Tratamiento	Descripción	Concentración (mg/L)	Referencia
T1	Testigo	0	-
T2	Tetraciclina	35	(Ligos, Turrientes, & Cisneros , 2009)
T3	Metilparabeno	100	Ensayos
T4	Metilparabeno	200	preliminares

Elaborado por: Los autores, 2020.

2.3.3 Unidad experimental

La unidad experimental consistió en un contenedor de vidrio de 4 cm de diámetro y 10 cm de alto, con 12 mL de medio de cultivo y una yema de *Rosa chinensis*.

2.3.4 Análisis estadístico

Se realizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con 4 tratamientos y 23 repeticiones.

2.3.4.1 Prueba de normalidad

Se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para contrastar la normalidad de los datos, utilizando el software InfoStat.

2.3.4.2 Prueba de Kruskal-Wallis y Análisis de varianza

Se realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, con un nivel de significancia al 5%, para determinar si el grupo de datos procede de la misma población, si el valor de p es menor o igual a 0,05 se rechaza la hipótesis nula, caso contrario se acepta (todos los tratamientos presentan el

mismo efecto). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para las variables con una distribución normal de datos, y la prueba de significancia de Duncan al 5%.

2.3.5 Variables y métodos de evaluación

Mediante una observación sistemática, las variables se registraron cada 7 días, durante 3 semanas.

2.3.5.1 Porcentaje de contaminación bacteriana

Se evaluó la formación de colonias bacterianas sobre el medio y/o explante (Figura 3), se calificó con 1 la presencia y 0 la ausencia de contaminación, y se contabilizó el número de explantes contaminados sobre el total de explantes por tratamiento, por 100.



Figura 3. Contaminación bacteriana en explantes de *R. chinensis*.
Elaborado por: Los autores, 2020.

2.3.5.2 Porcentaje de contaminación fúngica

Se evaluó el crecimiento de hongos sobre el medio y/o explante (Figura 4), se calificó con 1 la presencia y 0 la ausencia de contaminación, y se contabilizó el número de explantes contaminados sobre el total de explantes por tratamiento, por 100.



Figura 4. Formación de hongos sobre el medio y explante.
Elaborado por: Los autores, 2020.

2.3.5.3 Porcentaje de fenolización

Se evaluaron los tejidos que presentaron oscurecimiento (color café), resultado de la acumulación de fenoles producidos por un estrés oxidativo, se calificó con 1 la presencia y 0 la ausencia de fenolización, y se contabilizó el número de explantes fenolizados sobre el total de explantes por tratamiento, por 100.

2.3.5.4 Porcentaje de callogénesis

Se evaluó la formación de callo (masas celulares no diferenciadas blanquecinas) en los explantes (Figura 5a). Se calificó con 1 la presencia y 0 la ausencia de callo, y se contabilizó el número de explantes con tejido calloso sobre el total de explantes por tratamiento, por 100.

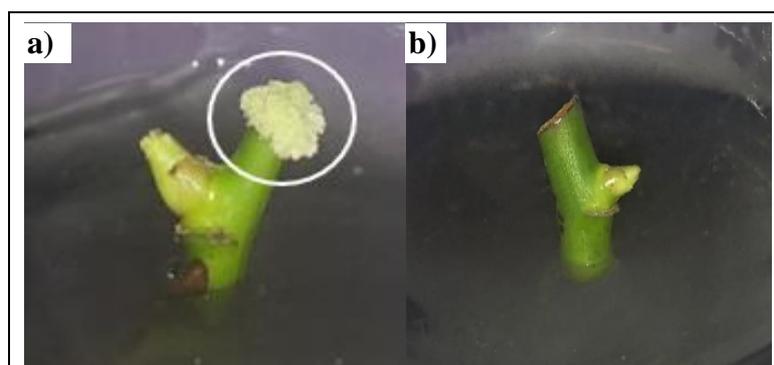


Figura 5. a) Formación de células callosas; b) Ausencia de callos en explantes de *Rosa chinensis*.
Elaborado por: Los autores, 2020.

2.3.5.5 Porcentaje de brotación

Se evaluó la brotación en los explantes, cuando el brote tenía una longitud aproximada de 1 cm (Figura 6a) y presentaba primordios foliares (Figura 6b). Se calificó con 1 la presencia y 0 la ausencia de brotación, y se contabilizó el número de explantes brotados sobre el total de explantes por tratamiento, por 100.

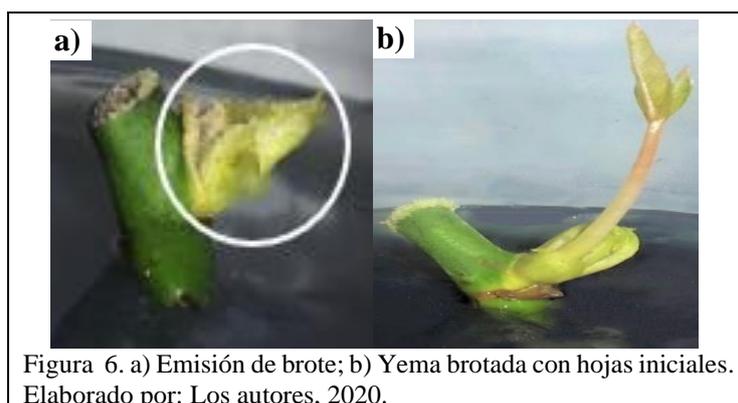


Figura 6. a) Emisión de brote; b) Yema brotada con hojas iniciales. Elaborado por: Los autores, 2020.

2.3.5.6 Longitud del brote (cm)

Al final de la fase se midió la longitud del brote (cm), con una regla desde la base del brote hasta el ápice de la hoja.

2.4 Fase II: Organogénesis

Los segmentos nodales fueron cultivados en medio de cultivo, durante esta fase se evaluaron dos concentraciones de sales MS y la posición de siembra de los explantes (Tabla 3), para evaluar la respuesta morfogénica (directa o indirecta).

Tabla 3.

Concentración de sales y posición de siembra de los explantes de *Rosa chinensis*.

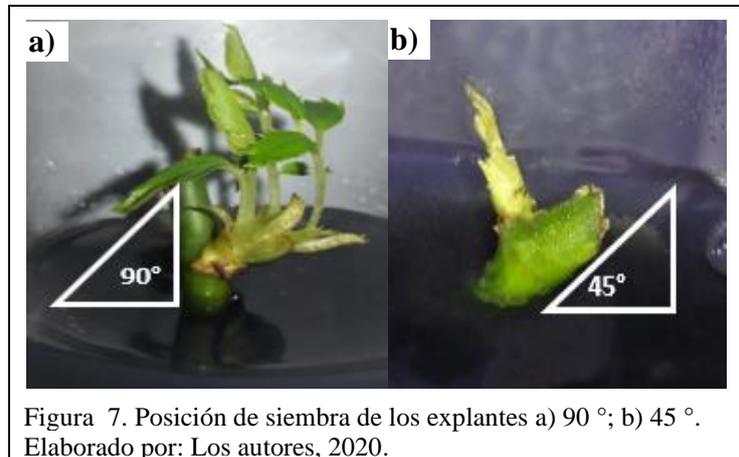
Tratamiento	Sales	Posición de siembra
S1P1	¼ MS	Vertical (90 °)
S1P2	¼ MS	Inclinado (45 °)
S2P1	½ MS	Vertical (90 °)
S2P2	½ MS	Inclinado (45 °)

Elaborado por: Los autores, 2020.

2.4.1 Factores de estudio

Concentración de sales inorgánicas: $\frac{1}{4}$ MS (S1) y $\frac{1}{2}$ MS (S2)

Posición de siembra: explantes sembrados de forma vertical a 90° , perpendiculares al medio (P1); y, explantes inclinados a 45° (P2), en relación al medio de cultivo (Figura 7).



2.4.2 Unidad experimental

La unidad experimental consistió en un contenedor de vidrio de 4 cm de diámetro y 10 cm de alto, con 12 mL de medio de cultivo y una yema de rosa.

2.4.3 Análisis estadístico

Se realizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con un diseño factorial 2×2 (2 concentraciones de sales MS por 2 posiciones del explante), con 6 repeticiones por tratamiento.

2.4.3.1 Prueba de normalidad

Se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para contrastar la normalidad de los datos (factores y tratamientos), utilizando el software InfoStat.

2.4.3.2 Prueba de Kruskal-Wallis y Análisis de varianza

Se realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, con un nivel de significancia al 5%, para determinar si el grupo de datos procede de la misma población. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para los factores y su interacción con una distribución normal de datos, y la prueba de significancia de Duncan al 5%.

2.4.4 Variables y métodos de evaluación

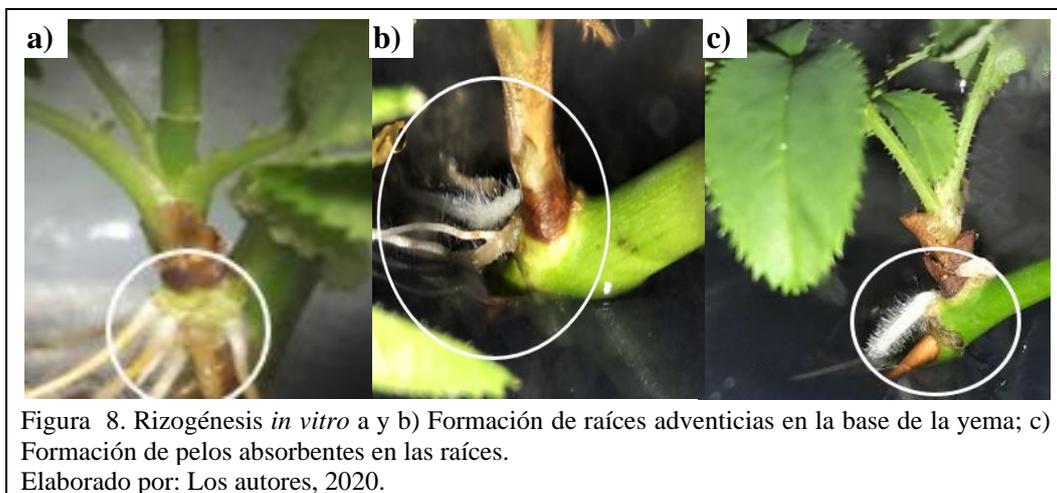
Mediante una observación sistemática, las variables se registraron cada 7 días, durante 3 semanas.

2.4.4.1 Porcentaje de brotación

Se evaluó la brotación en los explantes, cuando el brote tenía una longitud aproximada de 1 cm (Figura 6a) y presentaba primordios foliares (Figura 6b), se calificó con 1 la presencia y 0 la ausencia de brotación, y se contabilizó el número de explantes brotados sobre el total de explantes por tratamiento, por 100.

2.4.4.2 Porcentaje de enraizamiento

Se evaluó la formación de raíces adventicias simples y delgadas, con pelos radiculares en la base la yema (Figura 8), se calificó con 1 la formación y 0 la ausencia de raíces, y se contabilizó el número de explantes brotados sobre el total de explantes por tratamiento, por 100.



2.4.4.3 Porcentaje de callogénesis

Se evaluó la formación de callo (masas celulares no diferenciadas blanquecinas) en los explantes (Figura 5a). Se calificó con 1 la presencia y 0 la ausencia de callo, y se contabilizó el número de explantes con tejido calloso sobre el total de explantes por tratamiento, por 100.

2.4.4.4 Longitud del brote

Se midió la longitud del brote (cm), con una regla desde la base del brote hasta el ápice de la hoja superior.

2.5 Fase III: Aclimatación *ex vitro*

Las plántulas provenientes de la fase previa se adaptaron a sustrato. En esta fase se evaluaron dos tipos de sustratos (Tabla 4). Los sustratos fueron esterilizados en autoclave a 121 °C por 20 min y previamente hidratados con agua destilada estéril.

Tabla 4.

Sustratos utilizados en la fase de aclimatación *ex vitro* de *R. chinensis*.

Tratamiento	Sustratos
T1	Turba
T2	Tierra negra

Elaborado por: Los autores, 2020.

2.5.1 Unidad experimental

La unidad experimental consistió en un recipiente plástico con 130 g de sustrato y una vitroplanta de *Rosa chinensis*.

2.5.2 Análisis estadístico

Se realizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con 5 repeticiones por tratamiento.

2.5.2.1 Prueba de normalidad

Se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para contrastar la normalidad de los datos, utilizando el software InfoStat.

2.5.2.2 Prueba de Kruskal-Wallis y Análisis de varianza

Se realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis con un nivel de significancia al 5% para determinar si el grupo de datos procede de la misma población. Se realizó el análisis de varianza

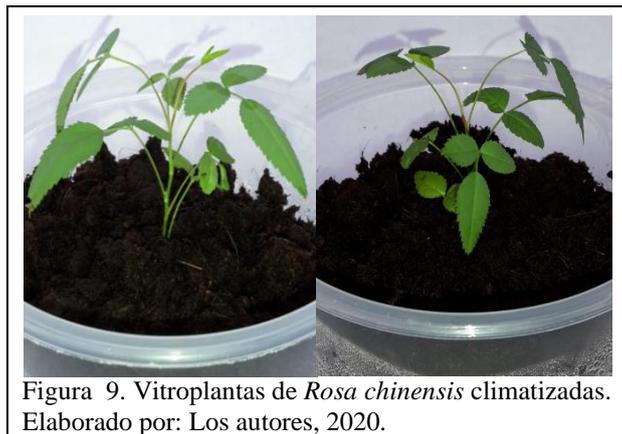
(ANOVA) para las variables con una distribución normal de datos, y la prueba de significancia de Duncan al 5%.

2.5.3 Variables y métodos de evaluación

Mediante una observación sistemática, se registró las variables cada 7 días, durante 3 semanas.

2.5.3.1 Porcentaje de sobrevivencia

Al final de la fase se contó el número de plántulas vivas que presentaban un buen desarrollo caulinar, con brotes de mayor longitud y hojas extendidas de color verde oscuro (característico de la especie) (Figura 9), con un sistema radicular vigoroso con pelos absorbentes engrosados y sin lesiones necróticas. Se calificó con 1 las plantas vivas y con 0 las plantas muertas, y se contabilizó el número de plantas vivas sobre el total de explantes por tratamiento, por 100.



2.5.3.2 Porcentaje de plantas enraizadas

Al final de la fase se contó el número de plántulas que presentaban un desarrollo de raíces adventicias y laterales. Se calificó con 1 las plántulas que enraizaron y con 0 las plántulas que no enraizaron, y se contabilizó el número de plantas enraizadas sobre el total de explantes por tratamiento, por 100.

2.5.3.3 Altura de la vitroplanta

Se midió la altura de la plántula (cm) al final de la fase, desde la base del cuello hasta el ápice de la hoja superior.

Capítulo 3

3 Resultados y discusión

3.1 Fase 1: Evaluación de antimicrobianos

Para determinar si el grupo de datos procede de la misma población, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis a las variables contaminación bacteriana y fúngica, fenolización, callogénesis y brotación. En el análisis no paramétrico, se rechazó la hipótesis nula para las variables contaminación bacteriana, fenolización y brotación, ya que presentaron diferencia estadística significativa ($p \leq 0,05$), indicando que al menos un tratamiento resultó diferente; al contrario, debido a que las variables porcentaje de contaminación fúngica y callogénesis no presentaron diferencia significativa ($p > 0,05$) se aceptó la hipótesis nula, lo que significa que todos los tratamientos son iguales. Por otro lado, en el análisis paramétrico, se rechazó la hipótesis nula en la variable longitud del brote debido a que los datos son estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$), indicando que al menos un tratamiento difirió del resto (Tabla 5).

Tabla 5.

Medianas para las variables contaminación bacteriana, contaminación fúngica, fenolización, callogénesis y brotación, y medias para la variable longitud del brote; en la fase de evaluación de antimicrobianos.

Tratamiento	C. B	C. F	F	C	B	L. B
T1	1,00 ^b	0,00	0,00 ^{ab}	0,00	1,00 ^{ab}	0,74 ^a
T2	0,00 ^{ab}	0,00	0,00 ^{ab}	0,00	0,00 ^a	0,42 ^a
T3	0,00 ^a	0,00	0,00 ^a	0,00	1,00 ^b	1,33 ^b
T4	0,00 ^{ab}	0,00	1,00 ^b	0,00	1,00 ^{ab}	0,69 ^a
p valor	0,0455 [*]	0,6409 ^{ns}	0,0235 [*]	0,3492 ^{ns}	0,0236 [*]	0,0027 ^{**}
H0	Rechaza	Acepta	Rechaza	Acepta	Rechaza	Rechaza

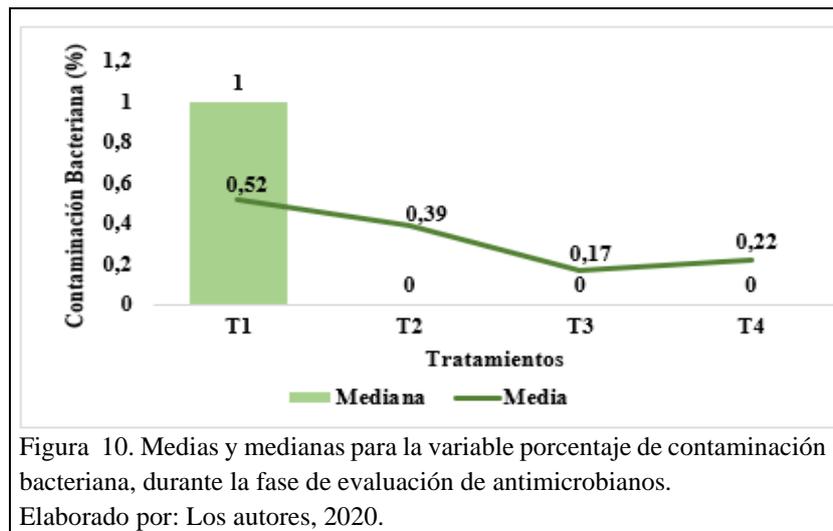
Nota: Letras en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

^{*} Diferencia significativa ($p \leq 0,05$); ^{**} Diferencia altamente significativa ($p \leq 0,01$); ^{ns} no significativo
C.B=Contaminación Bacteriana; **C.F**=Contaminación Fúngica; **F**=Fenolización; **C**=Callogénesis;
B=Brotación; **L.B**=Longitud del brote; **H0**=Hipótesis nula.

Elaborado por: Los autores, 2020.

3.1.1 Contaminación bacteriana

Al analizar la contaminación bacteriana, los tratamientos T2, T3 y T4, estadísticamente fueron iguales, el tratamiento T3 (100 mg/L Metilparabeno) presentó la menor tasa de contaminación bacteriana con una media de 17 % y mediana de 0 %, en cambio el T1 (Testigo), fue el peor tratamiento, presentando la mayor cantidad de explantes contaminados, con una media de 52 % y mediana de 100 % (Tabla 5, Figura 10).



Respecto al tratamiento T3 (100 mg/L Metilparabeno), la baja tasa de contaminación bacteriana (Figura 10), pudo deberse al efecto bacteriostático duradero del metilparabeno (Galeano, Rodríguez, Correa, & Caicedo, 1981), ya que al pertenecer a la familia de los parabenos son muy utilizados por su amplio espectro antimicrobiano (Ley, Mendaza, & Gómez, 2006). Elder (1984), reporta el efecto de metilparabeno a bajas concentraciones, contra hongos y bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas, resultados que concuerdan con la presente investigación, ya que al duplicar la concentración del metilparabeno en el medio (T4), la cantidad de explantes contaminados incrementó y resultó fitotóxico para los tejidos vegetales (Figura 10 y 11); al respecto Crovetto, Moreno, Dib, Espigares, & Espigares (2017), indican que el metilparabeno puede ser ampliamente usado debido a que presenta una baja toxicidad, sin embargo, es importante usarlo en bajas concentraciones.

La eficacia antimicrobiana que pueden presentar algunos estabilizantes biológicos, en algunos casos dependen de los mecanismos que utilicen para detener el crecimiento bacteriano y de su sitio diana, de esta manera, algunos pueden actuar bloqueando los mecanismos de resistencia, inhibiendo la síntesis transporte de precursores y organización estructural de la pared celular y reconfigurando la membrana citoplasmática (Calvo & Martínez-Martínez, 2009); en el caso de los parabenos, Nes & Eklund (1983), señalan que a pesar de que no se conoce con exactitud su modo de acción, se cree que podrían actuar sobre la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, interfiriendo en el transporte de precursores a través de la membrana de las bacterias, afectando enzimas como ATPasa y fosfotransferasas (Ma & Marquis, 1996), además alterando la integridad, permeabilidad y procesos de transporte de la membrana plasmática de los microorganismos que resulta en la liberación de componentes intracelulares (Valkova et al., 2001; Flasiński, Kowal, Broniatowski, & Wydro, 2018).

En cambio, en T1 (Testigo), la alta tasa de contaminación bacteriana (Figura 10), se atribuye a la ausencia de antimicrobianos y la presencia de contaminantes endógenos. Al respecto Moreno-Vázquez, Larrañaga, Uberhuaga, Bolacel, & Pérez-Ruíz (2014), señalan que a pesar de que la contaminación bacteriana se puede detectar de una manera visual, en algunos casos la aparición imprevista de bacterias puede deberse a que permanecen latentes por largos periodos en las plantas, o por una esterilización ineficaz del material vegetal, instrumentos, recipientes y medios de cultivo. Para evitar este problema Leifert, Morris, & Waites (1994), recomiendan incorporar antimicrobianos de amplio espectro al medio de cultivo, ya que al ser absorbidos por los tejidos internos de las plantas, pueden matar o suprimir el crecimiento de contaminantes, no obstante, se debe tener en cuenta que la mayoría de contaminantes bacterianos al ser Gram negativos, pueden presentar resistencia. Por ese motivo Hernández & García-Martínez (2017), consideran que el uso de antimicrobianos en el cultivo de células y

tejidos vegetales debe ser justificado, para evitar efectos negativos en el crecimiento vegetal y el aumento de cepas bacterianas resistentes.

El tratamiento T2 (35 mg/L Tetraciclina), presentó un promedio de 39 % de explantes contaminados (Figura 10). Por lo que, Patiño & Sepúlveda (2008), recomiendan no utilizar este antibiótico, ya que, por su acción bacteriostática, no provoca la muerte de las bacterias.

3.1.2 Contaminación fúngica

En cuanto a la variable contaminación fúngica, la adición de antimicrobianos no influyó sobre esta variable (Tabla 5).

El porcentaje de contaminación que se obtuvo fue de 4 – 13 % (Anexo 2), el bajo porcentaje se debe a la aplicación de Chlorothalonil en el pretratamiento a la planta donadora y sulfato de cobre pentahidratado en el protocolo de desinfección; el Chlorothalonil, es un fungicida de contacto de amplio espectro que protege a las plantas de infecciones fúngicas, y cuyo su mecanismo de acción es inhibir los procesos vitales en los hongos, ya que al no obtener la energía necesaria no pueden penetrar en las células vegetales y la infección no se produce (Edifarm, 2018); por otro lado, el sulfato de cobre pentahidratado, al ser un fungicida sistémico, su mecanismos es a nivel de la pared celular interfiriendo en los procesos reproductivos, mientras que su modo de acción es dar una protección efectiva contra los hongos a la planta, al permitir que los tejidos vegetales absorban y trasporten el cobre por el xilema y floema (Edifarm, 2019).

3.1.3 Fenolización

En la variable fenolización, los tratamientos T1, T2 y T3 fueron estadísticamente iguales, sin embargo, el tratamiento T3 (100 mg/L Metilparabeno) presentó la menor cantidad de explantes fenolizados con una media de 13 % y mediana de 0 %; mientras que, el T4 (200 mg/L

Metilparabeno), fue el peor tratamiento, presentando el mayor porcentaje de fenolización con una media de 57 % y mediana de 100 % (Tabla 5, Figura 11).

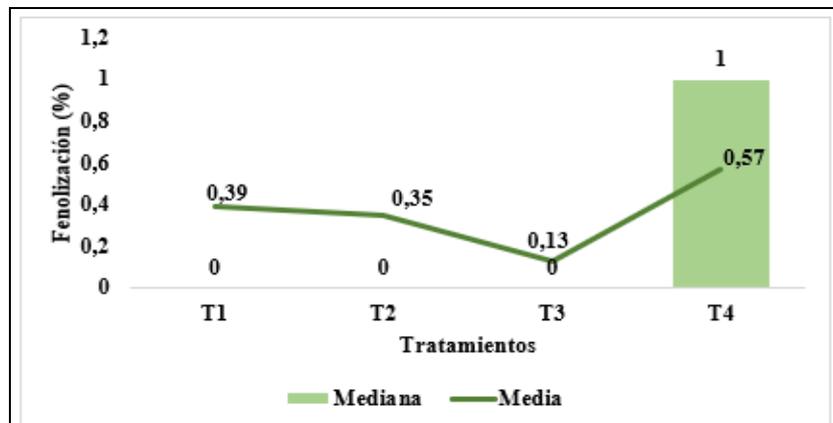


Figura 11. Medias y medianas para la variable porcentaje de fenolización, durante la fase de evaluación de antimicrobianos.

Elaborado por: Los autores, 2020.

Actualmente no existen ensayos que reporten el efecto del metilparabeno sobre la fenolización, no obstante, la baja cantidad de explantes fenolizados en T3 (100 mg/L Metilparabeno), podría ser por la actividad antimicrobiana y antioxidante que presentan los parabeno (Korotkova, Avramchik, Angelov, & Karbainov, 2005; Merkl, Hradkova, Filip, & Šmidrkal, 2010), en este caso el metilparabeno al ser un ester metílico del ácido 4-hidroxibenzoico (ácido monohidroxibenzoico), actúa como antioxidante (Velika & Kron, 2012; Pilco, 2019) y se encarga de secuestrar los radicales hidróxilo, que son muy reactivos y dañinos para los tejidos vegetales causando estrés oxidativo (Vargas, Rivas, Nursamaa, & Zoltan, 2007; San-Miguel & Martin-Gil, 2009; Carvajal, 2019).

En la investigación el usar el metilparabeno en bajas concentraciones, favoreció al control de la contaminación bacteriana y a su vez evitó la fenolización en los explantes en la fase de introducción al medio de cultivo; durante el proceso de cultivo *in vitro*, la fenolización puede ser un problema, puesto que al adicionar agentes químicos en el medio, pueden provocar un efecto abrasivo sobre los órganos y tejidos vegetales, provocando inhibición en su crecimiento, necrosamiento y muerte del tejido (Beckman, 2000; Krishna et al, 2008; Azofeifa, 2009), sin

embargo, en la presente investigación, la adición del antimicrobiano metilparabeno (100 mg/L) no provocó efectos fitotóxicos en los explantes, resultando ser una sustancia inocua a la concentración adecuada (Arias, 2006), no obstante, al duplicar su concentración (T4), el efecto fue adverso, debido a que el porcentaje de explantes fenolizados fue superior a 50 %, esto indicaría que concentraciones mayores a 100 mg/L en el medio de cultivo, pueden ser fitotóxicos, ya que según la sensibilidad que presenten las especies vegetales, el efecto puede variar.

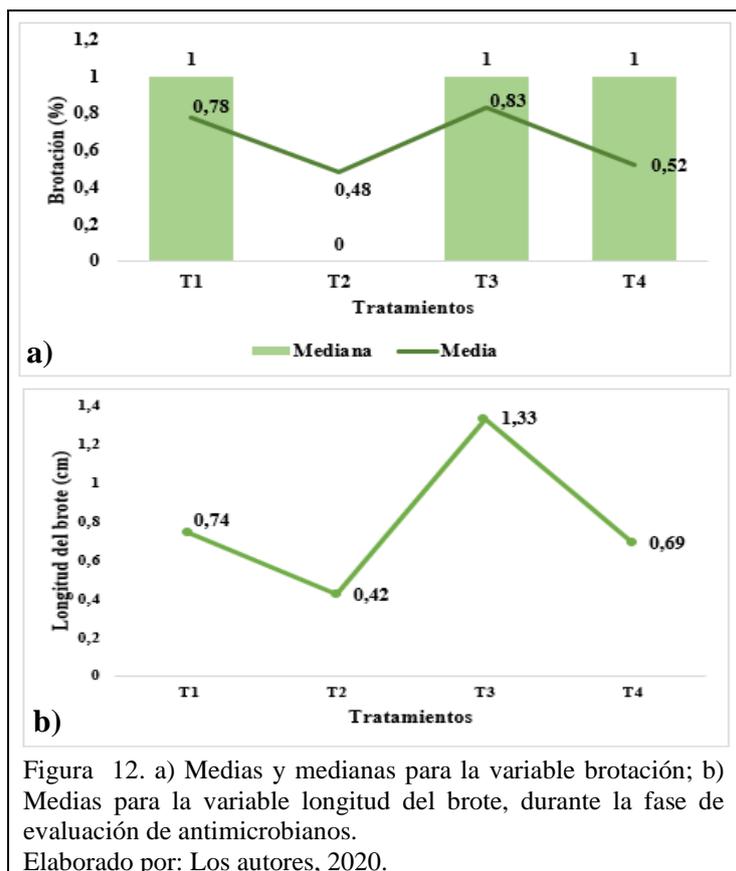
3.1.4 Calogénesis

En la variable calogénesis, todos los tratamientos resultaron iguales (Tabla 5), lo que indica que los antimicrobianos no influyeron en la obtención de una respuesta callogénica en los tejidos vegetales, presentando un porcentaje entre 4 – 17% (Anexo 3).

3.1.5 Brotación y longitud del brote

En la variable brotación, los tratamientos T1, T3 y T4 estadísticamente fueron iguales, el tratamiento T3 (100 mg/L Metilparabeno) presentó la mayor media y mediana con 100 % y 83 %, respectivamente, mientras que, el peor tratamiento fue T2 (35 mg/L Tetraciclina) con una media de 48 % y mediana de 0 % (Tabla 5, Figura 12a).

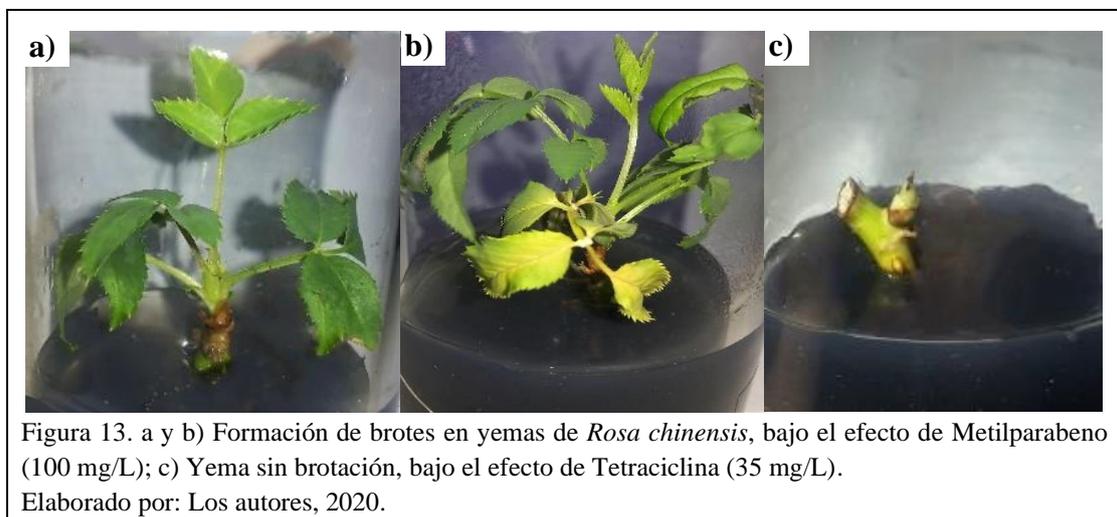
Respecto a la variable longitud del brote, el tratamiento que presentó la mayor longitud de brote fue T3, con una media de 1,33 cm; mientras que, el peor tratamiento fue T2 con una media de 0,42 cm (Tabla 5, Figura 12b).



Danilova & Dolgikh (2004), señalan que el crecimiento y activación de la morfogénesis por efecto de los antimicrobianos, puede ser por dos causas, por la exclusión de los microorganismos en los explantes sembrados o por la degradación de productos de los antimicrobianos que pueden presentar una actividad biológica, pero, debido a que algunos antimicrobianos pueden inhibir el crecimiento celular y regeneración de las plántulas, la estimulación de la morfogénesis puede depender de la especie, es así que el presente estudio, correspondería al primer informe del efecto estimulante del metilparabeno en el cultivo de *Rosa chinensis*, de acuerdo al resultado obtenido en el tratamiento T3 (Figuras 12, 13a y 13b).

En concentraciones muy bajas, algunos parabenos, pueden encontrarse de manera natural en algunas plantas y vegetales como la madrelella, aceitunas, zanahorias, palma de aceite, níspero, fresas, arándanos, entre otras (Kang, Parker, Smith, & Waldron, 2008; Huang, Zhang, Liu, & Li, 2012; Manuja, Sachdeva, Jain, & Chaudhary, 2013; Bosio et al., 2020; Ambarak, 2019),

debido a que los parabenos derivan del ácido benzoico (Arias, 2006), pueden tener efectos positivos sobre la fisiología de la planta, ya que se ha reportado que el ácido benzocico interviene en el crecimiento y desarrollo vegetal (Valdez, González-Morales, & Benavides, 2015), incrementa el número de hojas en repollo (Ramírez, Rancaño-Arrijoa, Benavides-Mendoza, Mendoza-Villarreal, & Padrón-Corral, 2006), estimula el crecimiento y producción de frutos/planta en chile piquín (Sandoval-Rangel, y otros, 2011), y aumenta el área foliar en plántulas de tomate y la altura en plántulas de tomatillo (Valdez, González, Valdez-Aguilar, Ramírez-Godina, & Benavides-Mendoza, 2015).



En cambio, el resultado obtenido en el tratamiento T2 (Figuras 12 y 13c) se le adjudica al efecto de la tetraciclina, ya que puede retardar e inhibir la multiplicación y enraizamiento de los explantes, lo que concuerda con Leifert et al. (1994). Además Pereira & Fortes (2003), señalaron que al adicionar diferentes concentraciones de tetraciclina, cloranfenicol, estreptomicina y ampicilina en el medio (32, 64, 128, 256, 512 y 1,024 mg/L), observaron efectos fitotóxicos en los tejidos vegetales junto con una baja tasa de crecimiento y multiplicación, en su estudio la tetraciclina no resultó efectiva, dado que interfirió en la tasa de multiplicación y altura de los brotes, provocando una disminución aproximada de 5 cm en la altura media de las plantas; por otro lado, los resultados obtenidos concuerdan con Carvalho et

al. (2017), quienes señalan que al usar tetraciclina en concentraciones de 5 a 15 mg/L se obtiene una mayor regeneración de los explantes, ya que valores superiores a 20 mg/L inhiben el crecimiento vegetal *in vitro* y causan muerte de los explantes. Por ese motivo para evitar la inhibición de morfogénesis en los tejidos vegetales Ligos, Turrientes, & Cisneros (2009), proponen utilizar la tetraciclina a una concentración de 30 mg/L, no obstante, Pollock, Barfield, & Shields (1983), plantean no utilizar tetraciclina, en razón de que puede resultar fitotóxico para las células vegetales, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la investigación.

3.2 Fase II: Organogénesis

En esta fase se sembraron los explantes en diferentes concentraciones de sales MS y se evaluó la posición de siembra del explante en el medio. Para determinar si el grupo de datos procede de la misma población, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis a las variables brotación y rizogénesis. En cambio, para las variables callogénesis y longitud del brote se realizó un análisis de varianza (Tabla 6).

Para la variable brotación se aceptó la hipótesis nula, en los tres factores evaluados debido a que no presentaron diferencia significativa ($p > 0,05$), lo que indica que todos los tratamientos fueron iguales. En la variable rizogénesis se rechazó la hipótesis nula en el factor posición de siembra e interacción entre ambos factores, ya que presentaron una alta significancia ($p \leq 0,01$), mostrando que al menos un tratamiento resultó diferente, por otra parte, se aceptó la hipótesis nula en el factor concentración de sales ya que no presentó diferencia estadística ($p > 0,05$), indicando que todos los tratamientos son iguales. En el análisis paramétrico, para la variable callogénesis en el factor concentración de sales se rechazó la hipótesis nula ya que presentó diferencia significativa ($p \leq 0,05$), demostrando que al menos un tratamiento es diferente, y en el factor posición de siembra e interacción entre ambos factores, se aceptó la hipótesis nula ya que no se observó diferencia estadística ($p > 0,05$), revelando que todos los tratamientos resultaron iguales, en cambio, en la variable longitud del brote, se rechazó la hipótesis nula en

el factor concentración de sales e interacción entre ambos factores, debido a que presentaron una alta significancia ($p \leq 0,01$), indicando que al menos un tratamiento difirió del resto, mientras que en el factor posición de siembra, se aceptó la hipótesis nula ya que los datos no presentaron diferencia significativa ($p > 0,05$), dando a entender que todos los tratamientos resultaron iguales (Tabla 6).

Tabla 6.

Medianas para las variables brotación, rizogénesis, y medias para las variables callogénesis y longitud del brote, al evaluar la concentración de sales MS, posición de siembra y su interacción, en la fase de organogénesis.

Factores	Tratamiento	Brotación	Rizogénesis	Callogénesis	Longitud del brote
Concentración de Sales (S)	S1	1,00	0,00	0,00 ^a	1,97 ^b
	S2	1,00	0,50	0,33 ^b	0,76 ^a
p valor		0,1482 ^{ns}	0,2156 ^{ns}	0,0369 [*]	0,0001 ^{**}
H0		Acepta	Acepta	Rechaza	Rechaza
Posición de siembra (P)	P1	1,00	0,00 ^a	0,17 ^a	1,68 ^a
	P2	1,00	1,00 ^b	0,17 ^a	1,05 ^a
p valor		0,1482 ^{ns}	0,0002 ^{**}	>0,9999 ^{ns}	0,1427 ^{ns}
H0		Acepta	Rechaza	Acepta	Acepta
S x P	S1P1	1,00	0,00 ^a	0,00 ^a	2,77 ^b
	S1P2	1,00	0,50 ^{ab}	0,00 ^a	1,17 ^a
	S2P1	1,00	0,00 ^a	0,33 ^a	0,58 ^a
	S2P2	1,00	1,00 ^b	0,33 ^a	0,93 ^a
p valor		0,0991 ^{ns}	0,0008 ^{**}	>0,9999 ^{ns}	0,0011 ^{**}
H0		Acepta	Rechaza	Acepta	Rechaza

Nota: Letras en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

^{*} Diferencia significativa ($p \leq 0,05$); ^{**} Diferencia altamente significativa ($p \leq 0,01$); ^{ns} no significativo

S1=¼ MS; **S2**=½ MS; **P1**=Vertical (90 °); **P2**=Inclinado (45 °); **H0**=Hipótesis nula

Elaborado por: Los autores, 2020.

3.2.1 Brotación

En la variable brotación, los tratamientos evaluados no influyeron en la respuesta, alcanzando una brotación entre 67 – 100 % (Anexo 4), por lo que se asume que la brotación en segmentos de *R. chinensis*, pudo ser influenciada por la concentración endógena de citoquinina producida por la propia planta (Yong, Ge, Ng, & Tan, 2009; Cortes, Godoy, Cortés, & Mora, 2019), la

cual al trasportarse desde el meristema radical hacia la parte aérea por medio del xilema, favorecen la producción de brotes en las yemas (Beveridge et al., 1997; Mok & Mok, 2001; Bürkle et al., 2003).

3.2.2 Rizogénesis

Para la variable rizogénesis, la mejor posición de siembra del explante fue P2 (Inclinado a 45 °), ya que presentó la mejor media con 75 % y una mediana de 100 % de regeneración de raíces (Tabla 6, Figuras 14 y 15a, 15b y 15c).

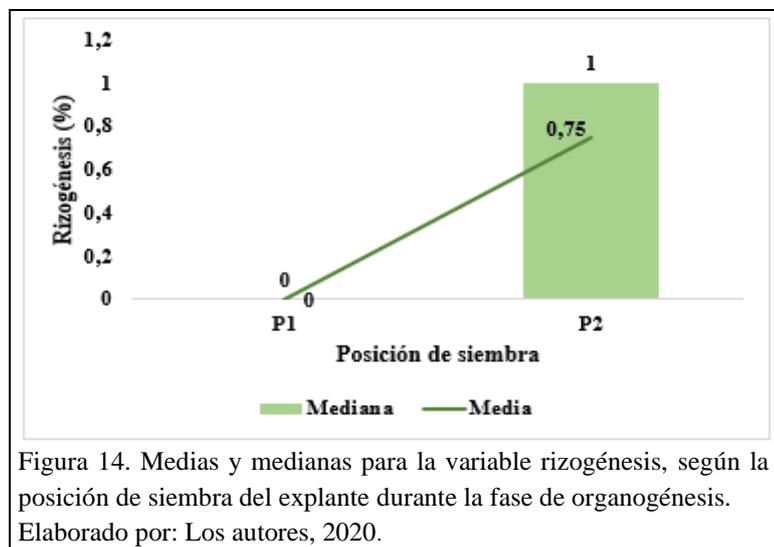
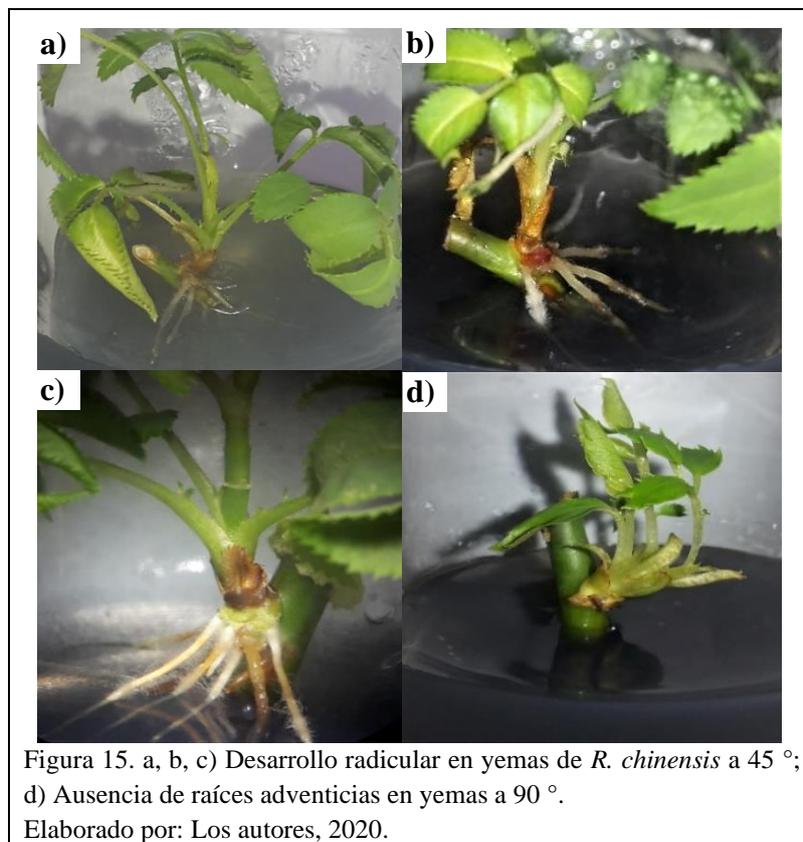


Figura 14. Medias y medianas para la variable rizogénesis, según la posición de siembra del explante durante la fase de organogénesis. Elaborado por: Los autores, 2020.

En función del resultado obtenido en P2, Band et al. (2012), señalan que el estímulo de gravedad generado por la inclinación a 45 °, induce el desarrollo de la raíz por la distribución dinámica de la auxina natural, su transporte en la planta es de dos maneras, el primero es rápido y a larga distancia, a través del floema las auxinas se transportan desde los tejidos inmaduros (altamente activos) hacia los tejidos sumideros como la raíz (Vanneste & Friml, 2009; Marchant et al., 2002), este tipo de transporte es importante para que se desarrolle la ramificación de los tallos y las raíces laterales; y el segundo transporte, es lento y a corta distancia, se da entre células por medio de proteínas transportadoras e influye en el desarrollo del tejido vascular, dominancia

apical y morfogénesis de la raíz, fruto y flor (Vanneste & Friml, 2009; Friml, 2003; Robert & Friml, 2009).



Si no existe un estímulo de gravedad (inclinación), se da un efecto adverso, inhibiéndose así el crecimiento de la capa de la raíz lateral en el lado inferior de la misma, que resulta en la ausencia de enraizamiento, lo que concuerda con la presente investigación, ya que los explantes sembrados a 90 ° no formaron raíces (0 %) (Figuras 14 y 15d).

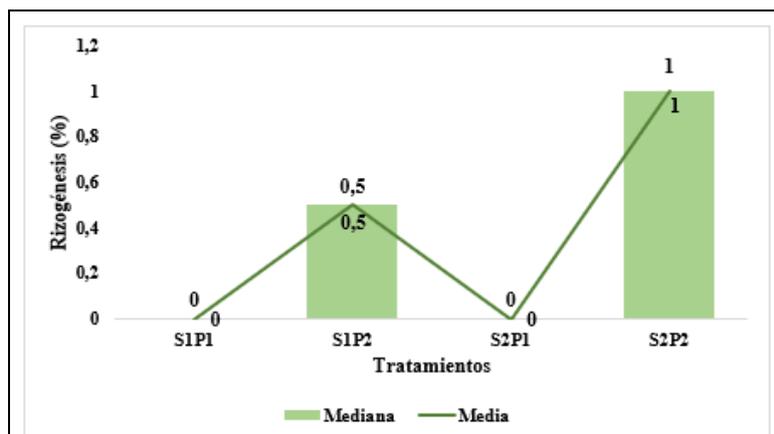


Figura 16. Medias y medianas para la variable rizogénesis según la interacción de sales y posición de siembra del explante, durante la fase de organogénesis.

Elaborado por: Los autores, 2020.

El mejor tratamiento para la interacción concentración de sales y posición de siembra del explante fue S2P2 ($\frac{1}{2}$ MS; 45°), con una media y mediana de 100 % de formación de raíces; mientras que, los peores tratamientos fueron S1P1 y S2P1 con una media y mediana igual a 0 % (Tabla 6; Figura 16). A pesar de que no existen reportes sobre la interacción entre las sales MS y la posición de siembra de los tejidos vegetales, algunos autores han reportado el efecto de las sales inorgánicas MS sobre el enraizamiento en diferentes cultivos, Jaramillo (2013), reporta que el 90 % de los brotes de *Myrcianthes hallii* enraizaron en $\frac{1}{2}$ MS; Ozel & Arslan (2006), probaron tres concentraciones de sales MS, obteniendo un porcentaje de enraizamiento del 50 % en MS diluido a la mitad de su concentración, 25 % en MS completo y 16,67 % en MS reducido a su cuarto de concentración, según los resultados obtenidos, los autores concluyeron que, el cultivo de rosa es dependiente de la concentración de sales y vitaminas, logrando que los explantes enraícen en $\frac{1}{2}$ MS; ElKichaoui (2014), evaluó cuatro concentraciones de sales MS (12,5; 25; 50 y 100 %), sin embargo, las concentraciones que presentaron mayor desarrollo radicular fueron 50 y 100 % de sales MS; Mamani-Sánchez & Murillo-García (2020) evaluaron dos variedades de frutilla en diferentes concentraciones de

sales (25, 50 y 75 %), y lograron que el 100 % de los explantes se enraícen con una mayor longitud de raíz en medios MS al 50 y 75 %, mientras que al 25 % no todos pudieron enraizar.

Respecto a la posición de siembra sobre la rizogénesis *in vitro*, se cree que la orientación inclinada de los tejidos vegetales pudo inducir la formación de raíces, al respecto Squeo & Cardemil (2006), señalan que al colocar las plantas en una posición inclinada, la fuerza de gravedad permite que las auxinas se distribuyan en la parte basal de los segmentos nodales, favoreciendo así el desarrollo radicular, no obstante, pocos ensayos han relacionado el efecto de auxinas endógenas en la organogénesis de las raíces, ya que la mayoría de literatura reporta el efecto de auxinas exógenas sobre la rizogénesis *in vitro*; Hu et al. (2017), indican que debido al transporte polar de la auxina desde los ápices de los brotes hacia el extremo basal, estas tienden a acumularse en las células madres que se encuentran en la punta de las raíces las cuales permiten formación y desarrollo de sistema radicular (Sabatini et al., 1999; Overvoorde, Fukaki, & Beeckman, 2010; Chen et al., 2014; Olatunji, Geelen, & Verstraeten, 2017). La respuesta observada en esta investigación, indica que el nivel endógeno de auxinas y la posición inclinada de los explantes de *R. chinensis* fue suficiente para permitir su enraizamiento.

3.2.3 Callogénesis

En la variable callogénesis, para el factor concentración de sales, el mejor tratamiento fue S2 ($\frac{1}{2}$ MS), debido a que presentó una mayor cantidad de explantes con células callosas, con una media de 33 % (Tabla 6, Figura 17).

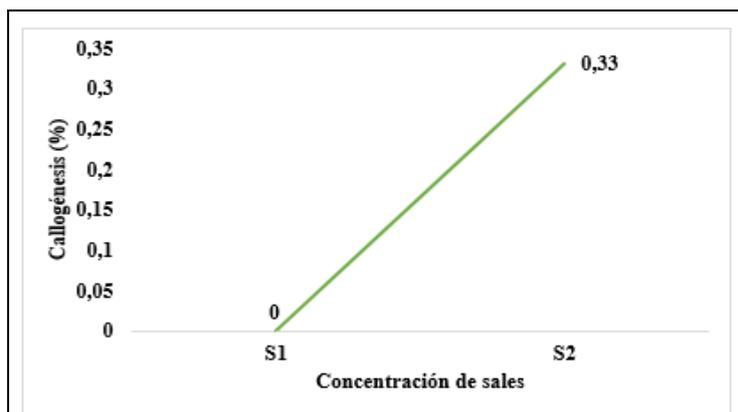


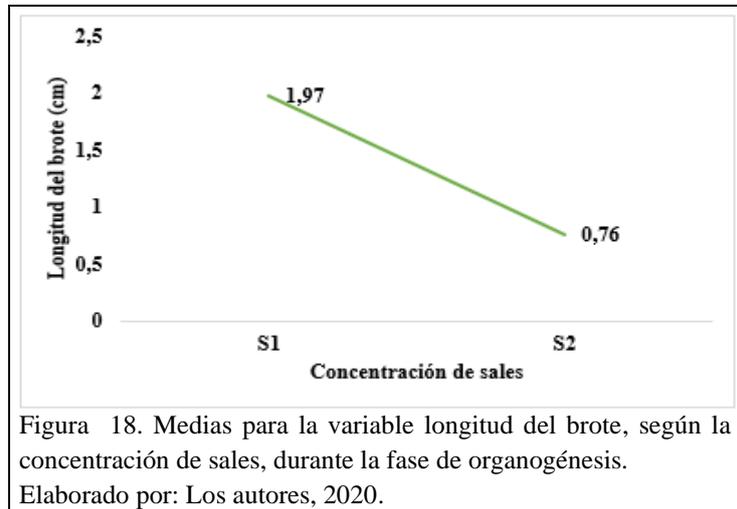
Figura 17. Medias para la variable callogenesis, según la concentración de sales, durante la fase de organogénesis.
Elaborado por: Los autores, 2020.

Similares resultados presentaron Vegas et al. (2016), ya que reportan bajo porcentaje de callogenesis (14,67 %) en medio MS sin la adición de reguladores de crecimiento, esta respuesta obtenida, no es tan frecuente, ya que la callogenesis depende del tejido vegetal y de las fitohormonas utilizadas (Rodríguez, Latsague, Chacón, & Astorga, 2014; Sánchez-Calvo & Alvarenga-Venutolo, 2015; Coutiño-Cortés, Bertolini, Iracheta-Donjuan, Ruíz-Montoya, & Valle-Mora, 2017); Salazar & Romero (1997) & Jaime et al. (2019), mencionan que el medio MS al contener los nutrientes necesarios para el establecimiento *in vitro*, puede favorecer la el crecimiento, desarrollo y formación de callos en varias especies vegetales, pero en la mayoría de casos, la callogenesis depende del tejido vegetal y de las fitohormonas utilizadas. Burger, Liu, Zary, & Lee (1990) y Rout, Debata, & Das (1992), reportan que las sales MS reducidas a la mitad de su concentración modificadas con BAP y NAA, favorecen la formación de callos en *Rosa hybrida*.

Para obtener una mayor proliferación de callos, varios factores deben ser considerados, como el tipo de explante inicial (edad, tamaño, genotipo y procedencia), composición del medio de cultivo y reguladores de crecimiento (Roca & Mroginski, 1993; Bhatia, Saurabh; Sharma, Kiran; Dahiya, Randhir; Bera, Tanmoy, 2015; Lee, Jeon, & Kim, 2002).

3.2.4 Longitud del brote

Para la variable longitud del brote, los explantes del tratamiento S1 ($\frac{1}{4}$ MS) presentaron más del doble de longitud, con una media de 1,97 cm; en cambio, en S2 ($\frac{1}{2}$ MS), la media fue de 0,76 cm (Tabla 6, Figura 18).



De acuerdo al resultado obtenido en S1, algunos autores reportan resultados similares, Curir, Damiano, & Cosmi (1986) y Valles & Boxus (1987), indican que, en el cultivo de rosas, se puede obtener una mayor proliferación y multiplicación de brotes al reducir las sales de amonio en el medio; Rodríguez (2018), obtuvo brotes de guayusa con un rango de 1 a 2,70 cm de longitud, en sales inorgánicas MS diluidas al 25 %; Freire, Carnevale, Alzugaray, & Bueno (2014), lograron brotes con una mayor longitud (1,97cm) en $\frac{1}{4}$ MS; Pedroza-Manrique & Arévalo (2009), señalan que propágulos de *Marchantia polymorpha* presentaron un mayor desarrollo vegetativo al diluir la concentración de las sales MS a un cuarto de su concentración en el medio de cultivo; Uribe, Delaveau, Garcés, & Escobar (2008), concuerdan con lo mencionado y añaden que al disminuir la concentración de sales en el medio, los explantes presentan un mejor desarrollo y vigor, observándose plantas saludables con hojas más verdes y grandes.

Pierik (1997), indica que el potencial osmótico del medio de cultivo, depende de la concentración de sales, por lo tanto, al incrementar la concentración de sales en el medio, el crecimiento y multiplicación de los brotes disminuye por la baja absorción de agua y nutrientes, el medio MS al 25 %, al presentar un mayor potencial osmótico, permite la hidratación de los brotes, pero la cantidad de nutrientes es limitante; en cambio, a pesar de que el medio MS al 50 %, presenta una mayor cantidad de nutrientes, la organogénesis *in vitro* disminuye (Pierik & Steegmans, 1975), como consecuencia del bajo potencial osmótico, que obstaculiza la absorción de agua y nutrientes (Martínez-Villegas et., 2015), lo mencionado concuerda con el resultado obtenido en S2 (½ MS), ya que a pesar de tener los nutrientes necesarios, la longitud de los brotes fue menos de la mitad en comparación con S1 (¼ MS), como consecuencia del bajo potencial osmótico.

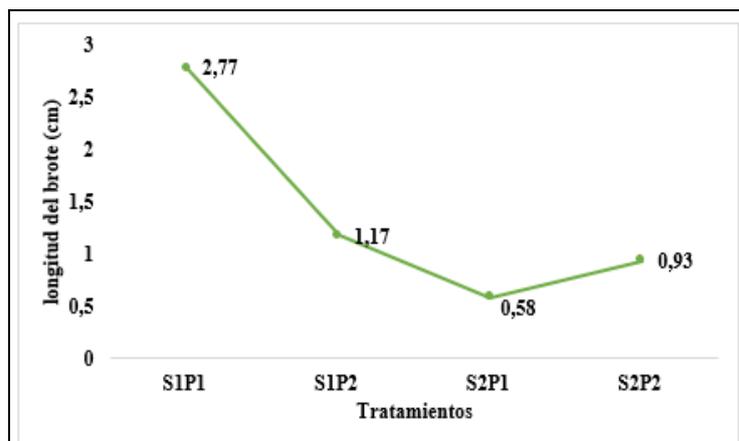
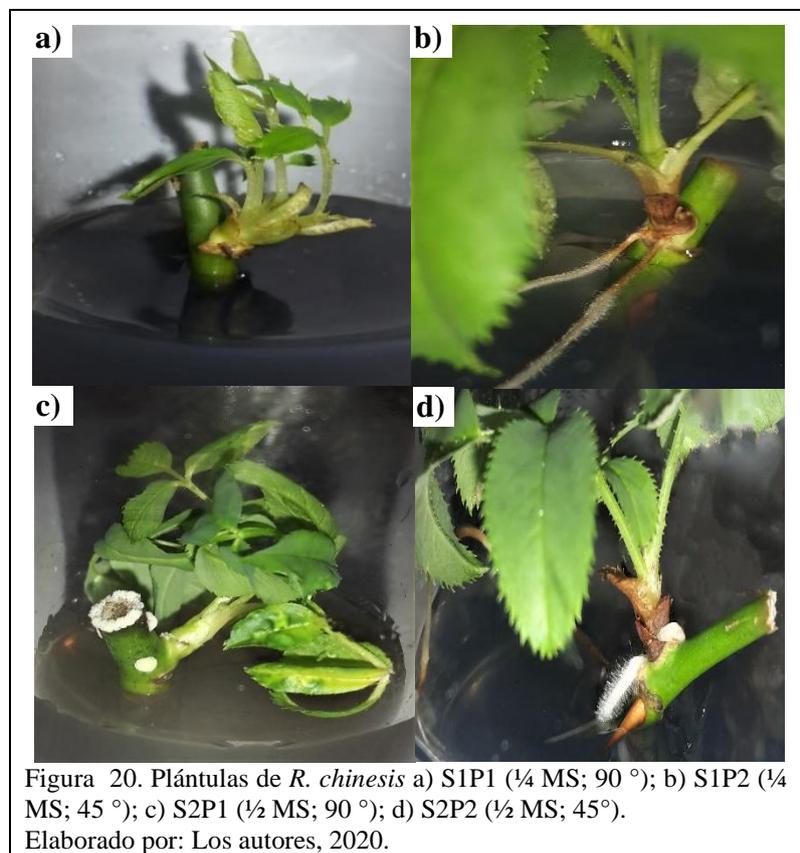


Figura 19. Medias para la variable longitud del brote, según la interacción de sales y posición de siembra, durante la fase de organogénesis.

Elaborado por: Los autores, 2020.

La longitud de los brotes varió desde 0,58 cm hasta 2,77 cm, el mejor tratamiento para la interacción concentración de sales y posición de siembra fue S1P1 (¼ MS; 90 °) con una longitud del brote de 2,77 cm (Figuras 19 y 20a). El tratamiento S1P1 presentó el mayor promedio entre todos los tratamientos, presentando incluso más del doble de longitud con respecto al tratamiento que se acerca S1P2 (¼ MS; 45 °), similares resultados reportan los siguientes autores, Freire, Carnevale, Alzugaray, & Bueno (2014), en ¼ MS reportan el 100 %

de brotes regenerados con una longitud de 3,35 cm; Lee-Espinosa et al (2016), obtuvieron una mayor producción de brotes completamente formados y vigorosos con una altura mayor a 1,5 cm al colocarlos en una posición vertical, en la investigación de Morales-Rubio, Rodríguez-Garza, & Garza-Padrón (2017), los explantes de *S. pruinosus* sembrados verticalmente presentaron una mayor proliferación de brotes (4,09 brotes/explante), respecto a la horizontal que presentó 3,69 brotes/explantes, también Purohit, Joshi, Tak, & Nagori (2004), reportan que el mayor número de brotes de *Wrightia tomentosa* se obtuvo en explantes con orientación vertical en el medio.



En el sistema vegetal, la organogénesis *in vitro*, depende de la complementariedad entre las citoquininas y auxinas. En la investigación debido a la gravedad generada por la inclinación de los explantes a 45° , la relación de auxinas/citoquininas fue mayor, induciendo una mayor producción de raíces (Figuras 20b y 20d) y brotes con una menor longitud; en cambio, en los

explantes sembrados a 90 °; al no existir un estímulo de gravedad, la relación de citoquininas/auxinas fue mayor, estimulando la formación de brotes vegetales de mayor longitud e inhibiendo el desarrollo de raíces (Figuras 20a y 20c); Porta & Jiménez-Nopala (2019), señalan que los reguladores de crecimiento, al localizarse en diferentes tejidos vegetales en cantidades específicas, pueden modular los diferentes procesos fisiológicos, en este caso las citoquininas naturales, son reguladores esenciales en el desarrollo y crecimiento vegetal, dado que permiten la iniciación de *novo* de brotes en diferentes tipos de explantes, al transportarse desde los meristemas de las raíces a través del xilema al resto de la planta, donde al concentrarse, eliminan la dominancia apical en los meristemas apicales del tallo favoreciendo la producción de brotes axilares en grandes cantidades (Van & Davey, 1979; Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010).

Cruzatty et al. (2015), sugieren que el material vegetal utilizado ya presentaba concentraciones adecuadas de citoquininas (endógenas), que favorecieron la inducción caulogénica *in vitro*. Sin embargo, debido a que algunas especies vegetales pueden tener bajas concentraciones de citoquininas endógenas, Quiala, Montalvo, & Matos (2004), sugieren adicionar de manera exógena citoquininas, para romper la dominancia apical e incrementar la proliferación de brotes en las yemas, no obstante, el obtener una respuesta morfogenética, en algunas ocasiones dependerá de una óptima relación de citoquininas/auxinas (endógenas o exógenas), la especie y el tipo de explante utilizado (Ahuja, 1993 citado en Cruzatty et al., 2015). En este caso la concentración de citoquininas endógenas en los meristemas apicales junto con el movimiento basipétalo de la auxina hacia los tejidos sumideros, influenciados por la orientación del explante favorecieron la producción de brotes y raíces en explantes de *R. chinensis* (Figura 20).

3.3 Fase 3: Aclimatación *ex vitro*

En esta fase se adaptaron las vitroplantas de *Rosa chinensis* a condiciones *ex vitro*, manifestando un buen desarrollo apical y radical. Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis a las

variables sobrevivencia y enraizamiento; mientras que, para la variable longitud de la vitroplanta se realizó un análisis de varianza.

En el análisis no paramétrico, se aceptó la hipótesis nula en las variables sobrevivencia y enraizamiento ya que no presentaron diferencia estadística significativa ($p > 0,05$), lo que indicó que todos tratamientos resultaron iguales, por otro lado, en el análisis paramétrico, se rechazó la hipótesis nula en la variable altura de la vitroplanta, puesto que los datos presentaron diferencia significativa ($p \leq 0,05$), indicando que al menos un tratamiento fue diferente del resto (Tabla 7).

Tabla 7.

Medianas para las variables sobrevivencia y enraizamiento, y medias para la variable altura de la vitroplanta, en la fase de aclimatación *ex vitro*.

Tratamiento	Sobrevivencia	Enraizamiento	Altura de la vitroplanta
T1	1,00	1,00	3,94 ^b
T2	1,00	1,00	3,12 ^a
p valor	>0,9999 ^{ns}	0,4444 ^{ns}	0,0257 [*]
H0	Acepta	Acepta	Rechaza

Nota: Letras en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

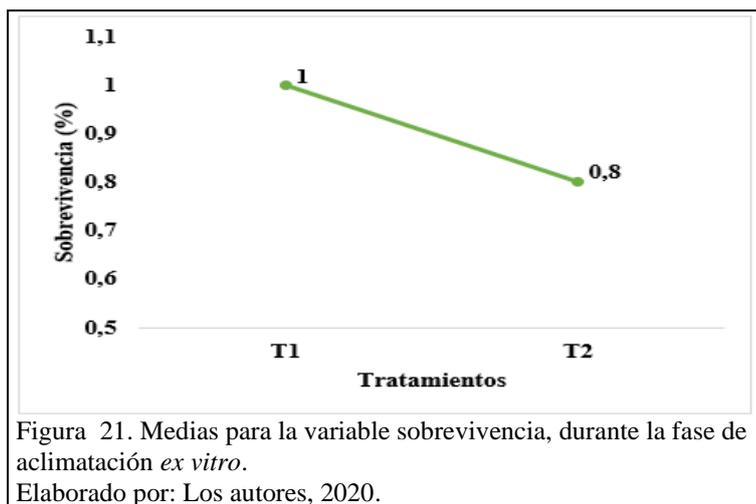
^{*} Diferencia significativa ($p \leq 0,05$); ^{ns} no significativo

T1= Turba; **T2**= Tierra negra; **H0**=Hipótesis nula

Elaborado por: Los autores, 2020.

3.3.1 Sobrevivencia

Al analizar la sobrevivencia de las plántulas de *R. chinensis*, los tratamientos T1 (Turba) y T2 (Tierra Negra) no influyeron sobre esta variable, debido a que el 100 % de la vitroplantas sobrevivieron cuando se las trasplantó en turba (T1) y el 80 % en tierra negra, (Tabla 7, Figuras 21 y 24).



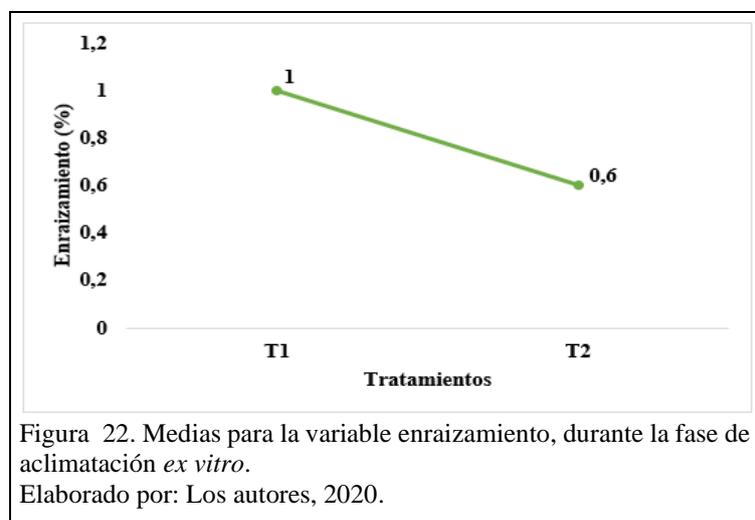
Los resultados obtenidos demostrarían que ambos sustratos fueron adecuados, favoreciendo así la sobrevivencia de las plántulas; Marval (2016), logró que el 82 % de plántulas de *E. elatior* se adapten a condiciones *ex vitro* al trasplantarles en sustratos de tierra negra; dicho sustrato se puede utilizar en la fase de aclimatización debido a su capacidad para retener suficiente agua y presentar una adecuada humedad, que permiten el crecimiento y desarrollo de las plantas (Cerón & Riascos, 2005).

Castillo et al. (2016), señalan que la adaptación *ex vitro* de las plántulas, puede resultar un cuello de botella, debido a que el éxito de esta fase depende de la transferencia de las plantas *in vitro* a condiciones de campo. Las plántulas que son producidas *in vitro*, demandan ciertas condiciones después de ser aclimatadas, ya que se desarrollan en un ambiente aséptico con alta humedad relativa, baja concentración de CO₂, alta concentraciones de nutrientes y azúcares, óptima temperatura, baja intensidad lumínica, además de presentar un aparato fotosintético deficiente (Gonzalez, 2008; Da Silva et al., 2015; Da Silva et al., 2017). Para activar la capacidad fotosintética en las plantas y asegurar su adaptación a condiciones medio ambientales, con un rápido crecimiento y alto porcentaje de supervivencia, Montes-Cruz, Lalama-Aguirre, Echeverría-Félix, & Salazar-Torres (2016), sugieren reducir gradualmente la humedad relativa en los recipientes, incrementar la intensidad lumínica, reducir los niveles de nutrientes y azúcares, elevar la cantidad de CO₂, pero también es importante considerar el

tamaño y calidad de las plántulas puesto que de eso dependerá su rápido crecimiento, desarrollo y producción en condiciones de campo (Espinosa-Reyes, Silva-Pupo, Bahi-Arevich, & Romero-Cabrera, 2019).

3.3.2 Enraizamiento

Respecto a la variable enraizamiento, los tratamientos evaluados no influyeron sobre esta variable (Tabla 7). En el tratamiento T1 (Turba), el 100 % de la vitroplantas lograron enraizar, y en T2 (Tierra Negra) el 60 % enraizaron (Figura 22).

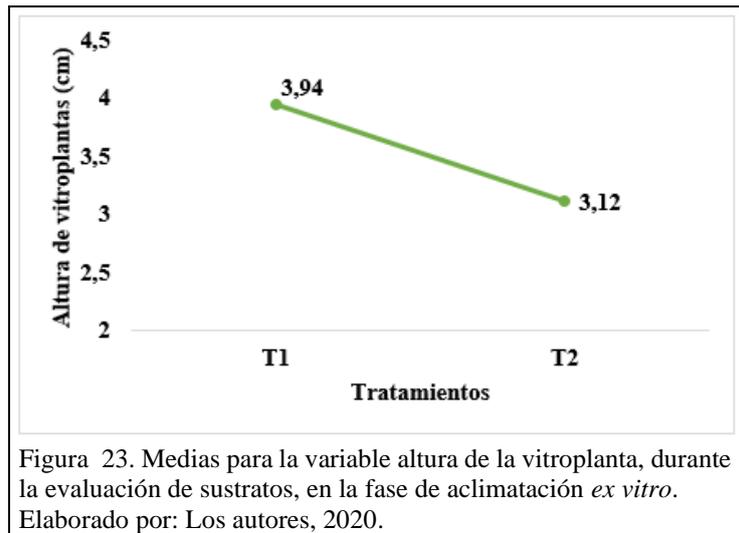


La turba es un sustrato que favorece el crecimiento de las raíces, debido a su capacidad para retener la humedad, alto contenido de nutrientes, composición porosa que facilita la expansión del sistema radicular y absorción de nutrientes, y adecuadas condiciones de aireación para las raíces (Álvarez-Herrera, Rodríguez, & Chacón, 2007; Gutierrez, 2017; Topcuoğlu & Turan, 2018).

Por el contrario, en T2 a pesar de que solo el 60 % de las plántulas de *R. chinensis* pudieron enraizar (Figura 22) alcanzaron un 80 % de supervivencia (Figura 21), similares resultados fueron presentados por Salazar, Vargas, De García, & Oropeza (2005), quienes lograron el mismo porcentaje de supervivencia al aclimatar vitroplantas de *Aster ericoides* en tierra negra (T2).

3.3.3 Altura de la vitroplanta

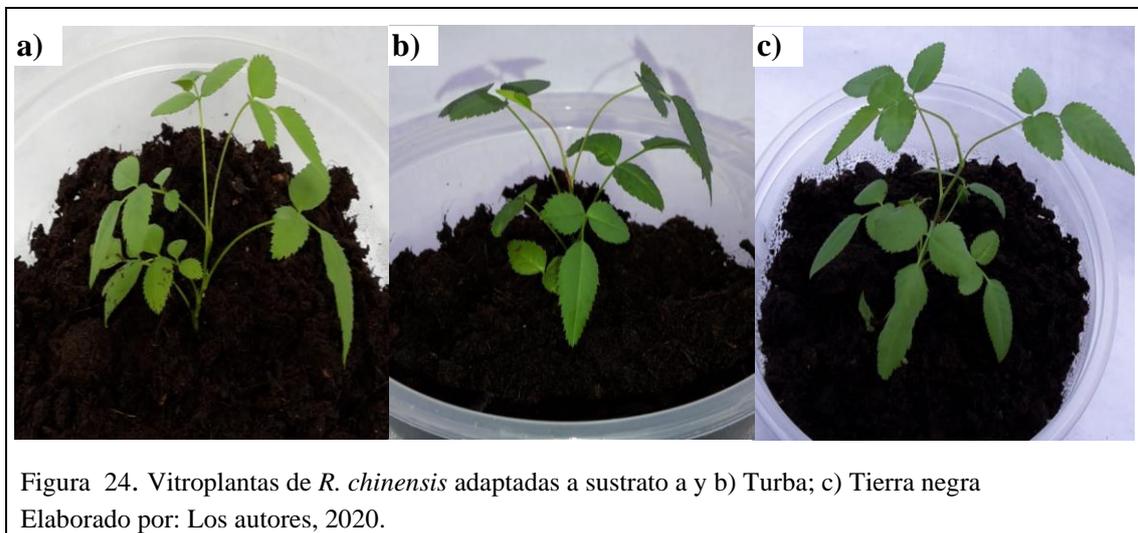
En la variable altura de la vitroplanta adaptada a sustrato, las plántulas que presentaron una mayor altura con un tamaño promedio de 3,94 cm corresponden al tratamiento T1, mientras que T2 fue el peor tratamiento donde la altura promedio alcanzada fue de 3,12 cm (Tabla 7, Figura 23).



La altura alcanzada (3,94 cm) con el sustrato turba, estaría relacionado con el porcentaje de enraizamiento (100 %) (Figura 22) y las propiedades que este presenta. La turba (sustrato químicamente activo) está hecha de materia orgánica descompuesta, presenta alta porosidad que facilita la circulación de agua y aire, tiene alto contenido de humedad que disminuye la desecación, proporciona de manera constante los nutrientes a las plantas, sirve de soporte y aumenta la calidad y productividad de los cultivos (Padilla, 2013; Guerrero & Polo, 1990; Kolay & Taib, 2018; Topcuoğlu & Turan, 2018; Kitir et al., 2018). Lo mencionado concuerda con García (2015), quien logró que el 93% de microbrotes de *Gentiana lutea* se adapten en turba, presentando una mayor longitud y número de hojas.

Por el contrario, el bajo porcentaje de enraizamiento (60 %) obtenido en el sustrato tierra negra (T2), pudo afectar la absorción de nutrientes evidenciándose plantas con un menor tamaño (3,12 cm); algunos autores sugieren combinarlo con otros sustratos, con el fin de que las plántulas

presenten un mayor porcentaje de enraizamiento (Marín, Riveros, & Botía, 2005; Royero, Vargas, & Oropeza, 2007). Montes-Cruz, Lalama-Aguirre, Echeverría-Félix, & Salazar-Torres (2016), mencionan que el tipo de sustrato que se utilice en la fase de aclimatación debe proveer a las raíces el agua y nutrientes suficientes para el crecimiento y desarrollo de la planta, el aire necesario para la respiración radicular, y el soporte necesario para el correcto anclaje del sistema radicular (Espinosa-Reyes, Silva-Pupo, Bahi-Arevich, & Romero-Cabrera, 2019). En este caso el sustrato tierra negra, no fue el adecuado para el crecimiento del tallo ni para el enraizamiento *ex vitro*.



Padilla (2013), obtuvo plántulas de *Solanum betaceum* con una mayor longitud, debido a que el sustrato sustrato (turba negra 20 % + turba rubia 80 %), influyó en su crecimiento, proporcionando una óptima humedad, aireación y soporte; lo que concuerda con la presente investigación, ya que las plantas adaptadas en turba presentaron la mayor altura y 100 % de sobrevivencia (Figura 24). El éxito de esta fase se debió a las características del sustrato, que favoreció el tamaño, aspecto, condición de las plántulas, y una mayor sobrevivencia de las mismas.

Conclusiones

El metilparabeno en concentraciones de 100 mg/L, fue el antimicrobiano más efectivo con el que se obtuvo mayor porcentaje de brotación (80 %), una longitud promedio de 1,3 cm, y menor contaminación (bacteriana y fúngica) y fenolización. Mientras que elevadas concentraciones de Tetraciclina (35 mg/L) influyeron de manera negativa sobre el crecimiento *in vitro* de los explantes.

Para la organogénesis *in vitro* de *R. chinensis*, el tratamiento más eficiente para rizogénesis fue P2 (45 °) y la interacción S2P2 (½ MS; 45 °) con un porcentaje de 75 % y 100 %, respectivamente. Para callogénesis fue S2 (½ MS) con una media de 33 %; y, para longitud del brote fue S1 (¼ MS) con 1,97 cm de longitud y la interacción S1P1 con 2,77 cm de longitud.

En la fase de aclimatación, la turba, favoreció como sustrato la adaptación de las plántulas con una supervivencia y enraizamiento del 100 %, y una altura promedio de 3,48 cm.

Recomendaciones

Evaluar el efecto del metilparabeno en concentraciones menores a 100 mg/L, sobre la respuesta morfogénica de diferentes explantes.

Disminuir la concentración de tetraciclina a 30 mg/L, para favorecer la disminución de la contaminación bacteriana y fenolización en la fase de introducción y aumentar el desarrollo de brotes de *R. chinensis*.

Experimentar en otras especies vegetales la posición de siembra de los explantes en el medio y su efecto en la organogénesis *in vitro*.

Bibliografía

- Abrahamian, P., & Kantharajah, A. (2011). Effect of vitamins on *in vitro* organogenesis of plant. *American Journal of Plant Sciences*, 2(5), 669-674. doi:10.4236/ajps.2011.25080
- Abreu, E., Castillo, M., Sol, G., & González, G. (2016). Efecto de antibióticos en la propagación *in vitro* de *Agave fourcroydes* Lem. *Biotecnología Vegetal*, 16(1), 31-36. Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/507/html>
- Acosta, J. A. (2015). Embriogénesis somática en café (*Coffea canephora* y *Coffea arabica*) para su aplicación y adopción de sistemas de micropropagación masal. (Tesis de grado). Universidad de Guayaquil, Guayaquil.
- Ahuja, M. (1993). *Biotechnology and clonal forestry*. Berlin, Heidelberg: Springer. doi:10.1007/978-3-642-84175-0_10
- Allevato, M. A., Negroni, R., & Galimberti, R. (2007). Antifúngicos ayer, hoy y mañana. *Act Terap Dermatol*, 30, 8-19. Obtenido de http://www.atdermae.com/pdfs/atd_30_01_02.pdf
- Alvarez, J., Bueno, N., Cuesta, C., Feito, I., & Ordás, R. (2020). Hormonal and gene dynamics in de novo shoot meristem formation during adventitious caulogenesis in cotyledons of *Pinus pinea*. *Plant Cell Reports*, 39, 527–541. doi:10.1007/s00299-020-02508-0
- Álvarez, M. (1980). *Agrotecnia de los rosales*. En: *Floricultura*. La Habana: Editorial Pueblo y Educación.
- Álvarez-Herrera, J. G., Rodríguez, S. L., & Chacón, E. (2007). Efecto de diferentes tamaños de esqueje y sustratos en la propagación del romero (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agronomía Colombiana*, 25(2), 224-230. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v25n2/v25n2a04.pdf>

- Ambarak, M. (2019). Determination of methylparaben in some cosmetics and pharmaceuticals using liquid-liquid extraction and spectrophotometric technique. *Chemical Methodologies*, 4(2), 192-201. doi:10.33945/SAMI/AJGC/2020.2.7
- Araruna, E., Ribeiro-Oliveira, J. P., Pereira, V. J., Asmar, S. A., & Melo, B. (2017). Salt concentrations in culture media for the development of *Dipteryx alata in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 52(12), 1295-1300. doi:10.1590/s0100-204x2017001200020
- Arias, D. M. (2006). Evaluación de cinco conservantes adicionados sobre diferentes tipos almidones para ser empleados en procesos de restauración en el patrimonio documental. (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Arzate-Fernández, A. M., Bautista-Puga, M. D., Piña-Escutia, J. L., Reyes-Díaz, J. I., & Vázquez-García, L. M. (2014). *Técnicas Tradicionales y Biotecnológicas en el mejoramiento genético del rosal (Rosa spp.)*. Toluca, México: UAEM, Facultad de Ciencias.
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153-175. Obtenido de http://www.mag.go.cr/rev_meso/v20n01_153.pdf
- Band, L., Wells, D., Larrieu, A., Hodgman, T., Pridmore, T., King, J., . . . Bennett, M. (2012). Root gravitropism is regulated by a transient lateral auxin gradient controlled by a tipping-point mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(12), 4668-4673. doi:10.1073/pnas.1201498109
- Barrett, C., & Cassells, A. (1994). An evaluation of antibiotics for the elimination of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* (Brown) from *Pelargonium x domesticum* cv. 'Grand Slam' explants *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36(2), 169-175. doi:10.1007/BF00037716

- Beckman, C. (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(3), 101-110. doi:10.1006/pmpp.2000.0287
- Beveridge, C., Murfet, I., Kerhoas, L., Sotta, B., Miginiac, E., & Rameau, C. (1997). The shoot controls zeatin riboside export from pea roots. Evidence from the branching mutant rms4. *The Plant Journal*, 11(2), 339-345. doi:10.1046/j.1365-313X.1997.11020339.x
- Bhatia, Saurabh; Sharma, Kiran; Dahiya, Randhir; Bera, Tanmoy. (2015). *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Academic Press.
- Bosio, M., Souza-Chaves, B., Gomes, J., Gmurek, M., Martins, R., Saggiaro, E., . . . Quint Ferreira, R. (2020). Electrochemical oxidation of paraben compounds and the effects of byproducts on neuronal activity. *Energy Reports*, 6(1), 903-908. doi:10.1016/j.egyr.2019.11.156
- Buczacki, S. (1997). *Rosales*. Madrid, España: Turisen, S.A.
- Burger, D., Liu, L., Zary, K., & Lee, C. (1990). Organogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Rosa hybrida* L. *Plant cell, tissue and organ culture*, 21(2), 147-152. doi:10.1007/BF00033434
- Bürkle, L., Cedzich, A., Döpke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., . . . Frommer, W. (2003). Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 34(1), 13-26. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01700.x
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas Microbiología*, 44-52. doi:10.1016/j.eimc.2008.11.001

- Canli, F., & Kazaz, S. (2009). Biotechnology of roses: progress and future prospects. *Türkiye Ormançılık Dergisi*, 10(1), 167-183.
- Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma spp.* y *Pseudomonas*. Una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), 15-31. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v14n2/v14n2a03.pdf>
- Carrazana, D., Herrera, L., Mollinedo, N., Suárez, N., Arboláez, I., Castellanos, H., & Martínez, T. (2003). Detección de contaminantes bacterianos y fúngicos endógenos en el establecimiento de *Musa spp.* *Biotecnología vegetal*, 3(1), 49-52. Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/211/607>
- Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100. Obtenido de https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091
- Carvalho, M., Oliveira, E., Souza, A., Pereira, J., Diamantino, M., & Oliveira, S. (2017). Cleaning cassava genotypes infected with cassava frogskin disease via *in vitro* shoot tip culture. *Genetics and Molecular Research*, 16(2). doi:10.4238/gmr16029556
- Castilla, Y. (2005). Cultivo de tejidos de rosas (*Rosa sp*): Un acercamiento a investigaciones recientes. *Cultivos Tropicales*, 26(4), 43-47. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193216160006.pdf>
- Castillo, A., Montañez, A., Docampo, R., Rodríguez, P., Cabrera, D., & Zoppolo, R. (2016). Micorrización de portainjertos de manzano micropropagados. *Cultivos Tropicales*, 37(1), 7-12. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362016000500001

- Cerón, C. P., & Riascos, Y. (2005). La calidad de suelos de ladera a partir del conocimiento de agricultores de Caldono en el suroeste de Colombia. *Agronomía Colombiana*, 23(1), 143-153.
- Chen, Q., Dai, X., De-Paoli, H., Cheng, Y., Takebayashi, Y., Kasahara, H., . . . Zhao, Y. (2014). Auxin overproduction in shoots cannot rescue auxin deficiencies in *Arabidopsis* roots. *Plant and Cell Physiology*, 55(6), 1072-1079. doi:10.1093/pcp/pcu039
- Clay, H., & Hubbard, J. (1977). *Tropical Shrubs*. Singapore: University Press of Hawaii.
- Corporacion Financiera Nacional. (2017). *Ficha sectorial: Cultivo de flores*. Obtenido de <https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/2017/10/FS-Cultivo-de-Flores-octubre-2017.pdf>
- Cortes, J., Godoy, J., Cortés, J., & Mora, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*, 17(32), 109-129. doi:10.25058/24629448.3639
- Cortes, J., Pérez, M., & Mora, R. (2017). Importancia de los cultivos vegetales *in vitro* para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. *BIOCIENCIAS*, 1, 71-83.
- Coutiño-Cortés, A. G., Bertolini, V., Iracheta-Donjuan, L., Ruíz-Montoya, L., & Valle-Mora, J. F. (2017). *In vitro* callogenesis induction of *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W.E. Higgins (Orchidaceae). *Acta Agronómica*, 66(2), 254-259. doi:10.15446/acag.v66n2.57982
- Crovetto, S., Moreno, E., Dib, A., Espigares, M., & Espigares, E. (2017). Bacterial toxicity testing and antibacterial activity of parabens. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 99(5-6), 858-868. doi:10.1080/02772248.2017.1300905

- Cruzatty, L., Carrasco, J., Morante-Carriel, J., Murillo, Osorio, B., & Olaya, J. (2015). Micropropagación *in vitro* de *Nothofagus alpina* utilizando fitohormonas. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 8(1), 1-10. Obtenido de https://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_V8%20N1%201Garcia%20et%20al.pdf
- Cuchut, J., & Murillo, R. (2019). Efecto de tres concentraciones de carbón activo y diferentes fuentes de carbono, en multiplicación de vitroplantas de papa imilla negra (*Solanum tuberosum* L. Ssp. andigena). *Revista Apthapi*, 5(2), 1616-1631.
- Curir, P., Damiano, C., & Cosmi, T. (1986). *In vitro* propagation of some rose cultivars. *Acta Horti* 189, 221-224. doi:10.17660/ActaHortic.1986.189.27
- Da Silva, J., Tsavkelova, E., Zeng, S., Tzi, N., Parthibhan, S., Dobránszki, J., . . . Rao, M. (2015). Symbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development. *Planta*, 242(1), 1-22. doi:10.1007/s00425-015-2301-9
- Da Silva, T., Hossain, M., Sharma, M., Dobránszki, J., Cardoso, J. C., & Songjun, Z. (2017). Acclimatization of *in vitro*-derived *Dendrobium*. *Horticultural Plant Journal*, 3(3), 110-124. doi:10.1016/j.hpj.2017.07.009
- Danilova, S., & Dolgikh, Y. (2004). The stimulatory effect of the antibiotic cefotaxime on plant regeneration in maize tissue culture. *Russian Journal of Plant Physiology*, 51(4), 559–562.
- De Menezes, L., PS Machado, M. d., Ballesta, P., Mora, F., Milaneze, M. A., & Mangolin, C. (2016). Suplementos orgánicos para el cultivo *in vitro* del híbrido *Laeliocattleya* (Orchidaceae). *Idesia*, 34(1), 47-54. Obtenido de

https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-34292016000100006

Diniz, J. D., Almeida, J., Oliveira, A., & Vidal, F. R. (2014). Multiplicação e enraizamento *in vitro* de Minirosa. *Revista Ciência Agronômica*, 45(1), 68-73. Obtenido de https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-66902014000100009

Edifarm. (2018). DACONIL® 720. Obtenido de https://gestion.edifarm.com.ec/edifarm_quickagro/pdfs/productos/DACONIL%20720-20181030-123011.pdf

Edifarm. (2019). PHYTON®. Obtenido de https://gestion.edifarm.com.ec/edifarm_quickagro/pdfs/productos/PHYTON-20191024-124655.pdf

Ei-Deen, A. N., Hadeer, D., El-Ghamdi, A., & Samra, B. (2015). Evaluating the pathogenicity of nematodes infecting roses at taif governorate, KSA. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(2), 1562-1567.

El Boullani, R., Lagram, K., El Mousadik, A., & Serghini, M. (2017). Effect of explants density and size on the *in vitro* proliferation and growth of separated shoots of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.). *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 8(7), 2469-2473. Obtenido de https://www.jmaterenvirosci.com/Document/vol8/vol8_N7/265-JMES-1646-El%20Boullani.pdf

El-Deeb, B., Bazaid, S., Gherbawy, Y., & Elhariry, H. (2012). Characterization of endophytic bacteria associated with rose plant (*Rosa damascena* trigintipeta) during flowering stage and their plant growth promoting traits. *Journal of Plant Interactions*, 7(3), 248-253. doi:10.1080/17429145.2011.637161

- Elder, R. (1984). Final report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben. *Journal of the American College of Toxicology*, 3(5), 147-209. doi:10.3109%2F10915818409021274
- ElKichaoui, A. (2014). *In vitro* propagation of strawberry (*Fragaria* × *annanasa* Duch.) through organogenesis via runner tips. *Ann. Pl. Sci*, 3, 619-627.
- Espinosa-Reyes, Á., Silva-Pupo, J. J., Bahi-Arevich, M., & Romero-Cabrera, D. (2019). Influencia del tamaño de las plantas *in vitro* y tipo de sustrato en la aclimatación de *Morus alba* L. *Pastos y Forrajes*, 42(1), 23-29. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942019000100023
- Expoflores. (2018). *Informe de exportaciones de rosas tercer trimestre 2018*. Quito, Ecuador. Obtenido de <https://expoflores.com/wp-content/uploads/2018/12/INFORME-TRIMESTRAL-3ER-TRIMESTRE-2018.pdf>
- Expoflores. (2019). *Informe Anual de Exportaciones*. Quito, Ecuador. Obtenido de https://expoflores.com/wp-content/uploads/2020/04/reporte-anual_Ecuador_2019.pdf
- Falkiner, F. (1997). Antibiotics in Plant Tissue Culture and Micropropagation—What are We Aiming at? *Pathogen and microbial contamination management in micropropagation*, 155-160. doi:10.1007/978-94-015-8951-2_18
- Fernández, C. F., Díaz, M. I., & González, L. R. (2016). Enraizamiento *in vitro* de embriones cigóticos de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart. *Colombia Forestal*, 19(1), 67-78. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/cofo/v19n1/v19n1a05.pdf>
- Fernández-Cuenca, S. M., Pascual, Á., Ribera, A., Rodríguez-Baño, J., Boue, G., Cisneros, J. M., . . . Vila, J. (2006). Prevalencia de los genes tetA y tetB como mecanismo de resistencia a tetraciclina y minociclina en aislamientos clínicos de *Acinetobacter*

- baumannii*. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 24(2), 77-80.
doi:10.1157/13085012
- Flasiński, M., Kowal, S., Broniatowski, M., & Wydro, P. (2018). Influence of parabens on bacteria and fungi cellular membranes: studies in model two-dimensional lipid systems. *The Journal of Physical Chemistry B*, 122(8), 2332-2340.
doi:10.1021/acs.jpcc.7b10152
- Fletcher, J., & Wayadande, A. (2009). Bacterias Fastidiosas Colonizadoras Vasculares. *The Plant Health Instructor*. Obtenido de <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/prokaryote/intro/Pages/FastidiousEspanol.aspx>
- Freire, R., Carnevale, N., Alzugaray, C., & Bueno, M. (2014). *In vitro* culture of *Schinus fasciculata* (Griseb) JM Johnst var. *fasciculata* (molle). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2(16), 169-173. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.35863
- Friml, J. (2003). Auxin transport-shaping the plant. *Current opinion in plant biology*, 6(1), 7-12. doi:10.1016/S1369526602000031
- Galeano, H., Rodríguez, G., Correa, N., & Caicedo, L. (1981). Ensayo comparativo de tres catalizadores en la producción de metil parabeno. *Chemical Abstracts*, 1-10.
- García, L. M. (2015). Cultivo *in vitro* de *Gentiana lutea*, L: fases de enraizamiento y aclimatación. (*Tesis de grado*). Universidad Politécnica de Catalunya, Castelldefels.
- García, L., Pérez, J., Rodríguez, M., Pérez, B., Martínez, Y., & Sarría, Z. (2004). Conservación *in vitro* de plantas de caña de azúcar. *Biotecnología Vegetal*, 4(2), 101-105.
- García, M., Araluce, C., Rubio, Y., Rodríguez, S., & Fera, R. (2004). Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth.

Biotecnología vegetal, 4(4). Obtenido de
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/434/html>

García-Luis, A., Bordón, Y., Moreira-Dias, J., Molina, R., & Guardiola, J. (1999). La orientación y la polaridad del explante determinan la respuesta morfogénica de los segmentos epicotilo del citrange de troyer. *Annals of Botany*, 84(6), 715-723. doi:10.1006/anbo.1999.0972

George, E., Hall, M., & De Klerk, G. J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (Vol. 1). Springer Netherlands.

Girón, W. I. (2008). Antimicrobianos. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas*, 5(2), 70-77.

Gonzalez, J. (2008). Aclimatización *in vitro* y *ex vitro*: una estrategia para mejorar la productividad de la micropropagación de plantas. *Reviste Revive: Biotecnología*.

Gordillo, L. (2019). Análisis histológico de la acción de las auxinas y citoquininas en la elongación de la raíz, discusión de la influencia de la mejora de la composición y calidad de los productos derivados. (*Tesis de grado*). Universidad de Extremadura, Badajoz.

Guerrero, F., & Polo, A. (1990). Usos, aplicaciones y evaluación de turbas. *Ecología*, 3-13.

Guerrero, M., Gómez-Kosky, R., & Bermúdez-Caraballoso, I. (2016). Obtención de plantas madre de *Vasconcellea x helbornii* (Badillo) Badillo a partir de estacas en condiciones semicontroladas. *Biotecnología Vegetal*, 16(1), 13-20. Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/505/pdf>

Gutierrez, S. M. (2017). Evaluación de seis sustratos para enraizamiento de rosa del desierto *Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult. (*Tesis de grado*). Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

- Henuka, R., Raju, D., Kumar, A., Janakiram, T., Namita, S, G., & J, R. (2015). Characterization and analysis of genetic diversity among different species of rose (*Rosa species*) using morphological and molecular markers. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 85(2), 240-245.
- Hernández, E., & García-Martínez, I. (2017). Brasinoesteroides en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 29(2), 77-84. Obtenido de <https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/editorial/index.php/agricolas/article/view/356/275>
- Hernández, Y., & González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4). Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400015
- Hu, W., Fagundez, S., Katin-Grazzini, L., Li, Y., Li, W., Chen, Y., . . . Li, Y. (2017). Endogenous auxin and its manipulation influence *in vitro* shoot organogenesis of citrus epicotyl explants. *Horticulture research*, 4(1), 1-6. doi:10.1038/hortres.2017.71
- Huang, W. Y., Zhang, H. C., Liu, W. X., & Li, C. Y. (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University Science B*, 13(2), 94-102. doi:10.1631/jzus.B1100137
- Indacochea, B., Julio, G., & Parrales, J. (2017). *Contribuciones de la UNESUM a la biotecnología vegetal*. Guayaquil, Ecuador: Grupo COMPAS, UNESUM.
- Jaime, K., Zacarías, M. d., Gómez, O., Zambrano, E., Fuentes, H., & Pérez, G. (2019). Inducción de brotes a partir de varas florales de la orquídea *Phalaenopsis spp.*(Blume) *in vitro*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(6), 1207-1218. doi:10.29312/remexca.v10i6.608&sa=D&ust=1571422366390000

- Jaramillo, K. (2013). Evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de arrayán (*Myrcianthes hallii*)(O. Berg) Mc vaugh. Quito, Pichincha. (Tesis de grado). Universidad Central del Ecuador, Quito.
- Jiménez, D., & Rodríguez, J. L. (2018). Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roehl) en la Mixteca Poblana. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(2), 124-131. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77084
- Jiménez-Mariña, L., Silva-Pupo, J., Borges-García, M., & Fonseca-Arias, M. (2016). Conservación *in vitro* del cultivo de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.) a partir de sales minerales. *Agronomía Mesoamericana*, 27(1), 177-181. Obtenido de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212016000100177
- Jofré, M., Ríos, D., Becerra, J., & Sánchez, M. (2016). Caracterización fisiológica del enraizamiento *in vitro* de *Eucalyptus nitens* y *Eucalyptus globulus*. *Gayana. Botánica*, 73(2), 421-429.
- Kang, Y., Parker, C., Smith, A., & Waldron, K. (2008). Characterization and distribution of phenolics in carrot cell walls. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(18), 8558-8564. doi:10.1021/jf801540k
- Kitir, N., Yildirim, E., Şahin, Ü., Turan, M., Ekinci, M., Ors, S., . . . Ünlü, H. (2018). Peat Use in Horticulture. *Peat*, 75. doi:10.5772/intechopen.79171
- Kolay, P., & Taib, S. (2018). Physical and geotechnical properties of tropical peat and its stabilization. *Peat*, 93. doi:10.5772/intechopen.74173

- Korotkova, E., Avramchik, O., Angelov, T., & Karbainov, Y. (2005). Investigation of antioxidant activity and lipophilicity parameters of some preservatives. *Electrochimica Acta*, 51(2), 324–332. doi:10.1016/j.electacta.2005.04.031
- Krishna, H., Sairam, R., Singh, S., Patel, V., Sharma, R., Grover, M., . . . Sachdev, A. (2008). Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. *Scientia horticulturae*, 118(2), 132-138. doi:10.1016/j.scienta.2008.05.040
- Kumud, S., Hem, P., & Vijay, R. (2015). Micropropagation of rose cultivars: Biotechnological application to floriculture. *Journal of Environmental Research And Development*, 10(1), 40-46.
- L'bachir El Kbiach, M., El Bouzdoudi, B., Saïdi, R., El Ansari, Z. N., Rahmouni, S., & Lamarti, A. (2017). Callogenesis of cork oak (*Quercus suber* L.) through *in vitro* culture of nodes and Internodes. *American Journal of Plant Sciences*, 8(8), 1801-1819. Obtenido de https://www.scirp.org/html/4-2603240_77448.htm
- Larson, R. (2013). *Introduction to Floriculture*. New York : Academic Press.
- Lee, K., Jeon, H., & Kim, M. (2002). Optimization of a mature embryo-based *in vitro* culture system for high-frequency somatic embryogenic callus induction and plant regeneration from japonica rice cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71(3), 237-244. doi:10.1023/A:1020305432315
- Lee-Espinosa, H., Nieto-Agustí, E., Murguía-González, J., Leyva-Ovalle, O., Landero-Torres, L., Galindo-Tovar, M., . . . Dávila-Lezama, M. (2016). Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, variedad "Eirete". *Agroproductividad*, 9(6), 51-55.

- Leifert, C., Morris, C., & Waites, W. (1994). Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants: reasons for contamination problems *in vitro*. *Critical reviews in plant sciences*, 13(2), 139-183. doi:10.1080/07352689409701912
- Leifert, C., Murphy, K., & Lumsden, P. (1995). Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14(2), 83-109. doi:10.1080/07352689509701923
- Leifert, C., Waites, B., Keetley, J., Wright, S., Nicholas, J., & Waites, W. (1994). Effect of medium acidification on filamentous fungi, yeasts and bacterial contaminants in *Delphinium* tissue cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36(2), 149-155.
- Leiva-Mora, M. (2006). Mejoramiento genético tradicional y empleo de técnicas biotecnológicas en la búsqueda de resistencia frente a los principales patógenos fúngicos de *Musa spp.* *Biotecnología Vegetal*, 6(3), 131-147. Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/414/713>
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Obtenido de <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/BiotecnologiayMejoramientovegetalII.pdf>
- Ley, B., Mendaza, F., & Gómez, L. (2006). Parabens: ¿mito o realidad? *Piel*, 21(5), 231-240. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213925106724765/first-page-pdf>
- Ligos, J., Turrientes, A., & Cisneros, O. (2009). Eficacia de cinco antibióticos frente a bacterias presentes en yemas de nogal adulto utilizadas en cultivo *in vitro*. *Sociedad Española de Ciencias Forestales*, 2-10. Obtenido de

http://secforestales.org/publicaciones/index.php/congresos_forestales/article/view/16906/16746

- Limsuwan, S., Trip, E., Kouwen, T., Piersma, S., Hiranrat, A., Mahabusarakam, W., . . . Kayser, O. (2009). Rhodomyrtone: A new candidate as natural antibacterial drug from *Rhodomyrtus tomentosa*. *Phytomedicine*, *16*, 645–651. doi:10.1016/j.phymed.2009.01.010
- Liu, X., Li, D., Zhang, S., Xu, Y., & Zhang, Z. (2019). Genome-wide characterization of the rose (*Rosa chinensis*) WRKY family and role of RcWRKY41 in gray mold resistance. *BMC Plant Biology*, 1-12.
- López, E. (2015). *Trabajos auxiliares en la elaboración de composiciones con flores y plantas (MF1114_1)*. España: Editorial Elearning S.L.
- Lumsden, P., Pryce, S., & Leifert, C. (1990). Effect of mineral nutrition on the growth and multiplication of *in vitro* cultured plants. *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, *9*, 108-113. doi:10.1007/978-94-009-2103-0_15
- Ma, Y., & Marquis, R. (1996). Irreversible paraben inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5. *Letters in applied microbiology*, *23*(5), 329-333. doi:10.1111/j.1472-765x.1996.tb00201.x
- Madox, D. (1982). The role of p-hydroxybenzoates in modern cosmetics. *Cosmetics and Toiletries*, 85-88.
- Majada, J. P., Sánchez-Tamés, R., & Sánchez-Moreiras, A. (2003). La Ecofisiología Vegetal: Una Ciencia de Síntesis. 1017-1054.

- Mamani-Sánchez, B., & Murillo-García, R. A. (2020). Micropropagación de dos variedades de frutilla (*Fragaria Ananassa* Duch.) en diferentes medios de cultivo. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 7(1), 69-78.
- Manuja, R., Sachdeva, S., Jain, A., & Chaudhary, J. (2013). A comprehensive review on biological activities of p-hydroxy benzoic acid and its derivatives. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 22(2), 109-115.
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P., Bennett, M., & Sandberg, G. (2002). AUX1 promotes lateral root formation by facilitating Indole-3-Acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* Seedling. *The Plant Cell*, 14(3), 589-597. doi:10.1105/tpc.010354
- Marín, G., Riveros, E., & Botía, F. (2005). Uso de aserrín y acículas como sustrato de germinación y crecimiento de quercus. *Colombia forestal*, 9(18), 98-108. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/4239/423939557008.pdf>
- Martin, D. (2017). Embriogénesis somática: una herramienta biotecnológica para la propagación *in vitro* de guayaba. *Biotecnología Vegetal*, 17(4), 209-220. Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/563/html>
- Martín, D., Cárdenas, O., & Cárdenas, A. (2013). Almidón de papa, agente gelificante alternativo en medios de cultivo para propagación *in vitro* de Lulo *Solanum quitoense* Lam. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 30(1), 3-11.
- Martínez-Villegas, Y., Andrade-Rodríguez, M., Colinas-León, M., Villegas-Torres, Ó., Castillo-Gutiérrez, A., & Alia-Tejacal, I. (2015). Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pascuíta (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). *Revista fitotecnia mexicana*, 38(4), 369-374. Obtenido de

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802015000400004

- Marval, R. (2016). Establecimiento de un sistema eficiente de propagación *in vitro* de *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith. (Tesis de grado). Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- McClelland, M., & Smith, M. (1990). Vessel type, closure, and explant orientation influence *in vitro* performance of five woody species. *HORTSCIENCE*, 25(7), 797-800. doi:10.21273/HORTSCI.25.7.797
- MEMMERT. (2019). *Cámara de clima constante HPP Incubador refrigerado por sistema Peltier IPPplus*. Alemania.
- Méndez-Álvarez, D., & Abdelnour-Esquivel, A. (2014). Establecimiento *in vitro* de *Terminalia amazonia* (Gmel.) Excell. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 11(27), 7-21.
- Merkel, R., Hradkova, I., Filip, V., & Šmidrkal, J. (Merkel, R; Hradkova, I; Filip, V; Šmidrkal, J; de 2010). Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic acids alkyl esters. (C. J. Sciences, Ed.) *Czech Journal of Food Sciences*, 28(4). doi:10.17221/132/2010-CJFS
- Mok, D., & Mok, M. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annual review of plant biology*, 52(1), 89-118. doi:10.1146/annurev.arplant.52.1.89
- Montes-Cruz, S., Lalama-Aguirre, J., Echeverría-Félix, J., & Salazar-Torres, S. (2016). Factores bióticos y abióticos que influyen en la aclimatación de las vitroplantas en invernadero. *Dominio de las ciencias*, 2, 63-89.
- Montilla de Bravo, I., Fernández, S., Alcalá de Marcano, D., & Gallardo, M. (1997). *El cultivo de la Piña en Venezuela*. Venezuela: IICA.

- Morales-Rubio, M. E., Rodríguez-Garza, R. G., & Garza-Padrón, R. A. (2017). Efectividad de las citocininas y tipo de corte en la brotación *in vitro* de cactáceas. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*, 3(8), 42-54.
- Morejón, M., Salup, R., & Cué, M. (2003). Actualización en tetraciclinas. *Revista Cubana de Farmacia*, 37(3), 1. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152003000300008
- Moreno, J. A., Pérez, C., Moreno, I., & Moreno, J. (2019). Effect of culture medium on morphogenic processes *in vitro* in *Cinchona officinalis* L. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 51(1), 55-68. Obtenido de <http://revistas.uncu.edu.ar/ojs3/index.php/RFCA/article/view/2337/1711>
- Moreno, R. J., Moreno, M., Ruffo, K., & Gómez-Kosky, R. (2001). Influencia de la concentración de agar sobre la multiplicación *in vitro* de *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. *Biotechnología vegetal*, 1(2), 77-81. Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/64/html>
- Moreno-Vázquez, S., Larrañaga, N., Uberhuaga, E., Bolacel, E. J., & Pérez-Ruíz, C. (2014). Bacterial contamination of *in vitro* plant cultures: confounding effects on somaclonal variation and detection of contamination in plant tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 119(3), 533–541. doi:10.1007/s11240-014-0553-x
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *15*(3), 473-497.
- Murillo-Talavera, M., Pedraza-Santos, M., Gutiérrez-Rangel, N., Rodríguez-Mendoza, M., Lobit, P., & Martínez-Palacios, A. (2016). Calidad de luz y desarrollo *in vitro* de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis* (Orquidaceae). *Agrociencia*, 50(8), 1065-1080. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/302/30249305009.pdf>

- Nes, I., & Eklund, T. (1983). The effect of parabens on DNA, RNA and protein synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Microbiology*, 54(2), 237-242. doi:10.1111/j.1365-2672.1983.tb02612.x
- Olatunji, D., Geelen, D., & Verstraeten, I. (2017). Control of endogenous auxin levels in plant root development. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12). doi:10.3390/ijms18122587
- Orlikowska, T., Cranston, H., & Dyer, W. (1995). Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration of the safflower cultivar 'centennial'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 40(1), 85–91.
- Orlikowska, T., Nowak, K., & Reed, B. (2017). Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 128(3), 487–508. doi:10.1007/s11240-016-1144-9
- Overvoorde, P., Fukaki, H., & Beeckman, T. (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(6). doi:10.1101/cshperspect.a001537
- Ozel, A., & Arslan, O. (2006). Efficient micropropagation of English shrub rose heritage under *in vitro* conditions. *International Journal of Agriculture & Biology*, 8, 626-629. Obtenido de http://www.fspublishers.org/published_papers/47564_..pdf
- Padilla, V. I. (2013). Evaluación de sustratos para la obtención de plantas de tomate de árbol (*Solanum Betaceum*) con la utilización de bandejas (Bachelor's thesis). (*Tesis de grado*). Universidad Técnica de Ambato, Cevallos
- Palacios-Arriaga, Adrián, H., & Rout, N. P. (2019). Efecto de diferentes medios y sustratos en el enraizamiento y adaptación de rosa transgénica. *Agronomía Mesoamericana*, 30, 115-129. Obtenido de <https://www.redalyc.org/jatsRepo/437/43757673008/html/index.html>

- Parismoreno, L., Gordillo, F., & Santos, E. (2016). Determinación de tiazurón (tdz) para la fase de multiplicación *in vitro* de caimito (*Chrysophyllum cainito* L.). *Yachana Revista Científica*, 5(2), 25-31.
- Patiño, N., & Sepúlveda, A. (2008). Tetraciclinas. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 51(1), 29-32. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2008/un081g.pdf>
- Paz, M. d. (2000). Ensayo agroeconómico para el establecimiento de *Rosa multiflora* Thund. *in vitro*. (Tesis de grado). Zamorano.
- Pedroza-Manrique, J. A., & Arévalo, M. C. (2009). Evaluación del efecto del medio MS y la temperatura en el desarrollo de propágulos de *Marchantia polymorpha* L.(Marchantiaceae) bajo condiciones *in vitro* y *ex vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 85-104. Obtenido de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/11713/37209>
- Pereira, J., & Fortes, G. (2003). Toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* da batata em meios semi-sólido e líquido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(11), 1273-1279. doi:10.1590/S0100-204X2003001100004
- Pérez, A., & Chamorro, L. (2013). Bacterias endófitas: un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 439-462. Obtenido de <https://revistas.unisucre.edu.co/index.php/recia/article/view/457/503>
- Pérez, J. F. (2006). *Cultivo in vitro de plantas y sus aplicaciones en agricultura*. Panamá: ARTE Comunicación Visual S.L.

- Pérez, J., & Cornejo, M. J. (2014). *Cómo y por qué trabajamos con células vegetales*. Valencia, España: Publicacions de la Universitat de València.
- Pérez-Bernal, M., Delgado, M., Hernández, C., & Armas, R. (2008). Organogénesis indirecta a partir de meristemas apicales caulinares de la variedad cubana de arroz reforma. *Cultivos Tropicales*, 29(1), 23-28. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193221581004.pdf>
- Pierik, R. L. (1997). *In vitro culture of higher plants*. The Netherlands: Kluwer Academy Publishers.
- Pierik, R. L., & Steegmans, H. (1975). Analysis of adventitious root formation in isolated stem explants of *Rhododendron*. *Scientia Horticulturae*, 3(1), 1-20. doi:10.1016/0304-4238(75)90031-X
- Pilco, S. C. (2019). Concentración de metilparabeno en soluciones anestésicas locales: lidocaína mepivacaína y articaína mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). (*Tesis de grado*). Universidad Politécnica Salesiana, Quito.
- Pollock, K., Barfield, D., & Shields, R. (1983). The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. *Plant cell reports*, 2(1), 36-39. doi:10.1007/BF00269232
- Porta, H., & Jiménez-Nopala, G. (2019). Papel de las hormonas vegetales en la regulación de la autofagia en plantas. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 22, 1-11. doi:10.22201/fesz.23958723e.2019.0.160
- Pressi, G., Bertaiola, O., Guarnerio, C., Barbieri, E., Faggian, M., Carriero, F., . . . Dall'Acqua, S. (2019). *Rosa chinensis in vitro* cell cultures: a phytocomplexrich of medium molecular weight polysaccharides with hydrating properties. *Natural Product Research*, 1-4.

- Prieto, H., Jordan, M., Barrueto, P., Rocha, M. C., & Durzan, D. (2005). *Biotecnología Vegetal*. Santiago, Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA).
- Purohit, S., Joshi, P., Tak, K., & Nagori, R. (2004). Development of high efficiency micropropagation protocol of an adult tree—*Wrightia tomentosa*. *Plant Biotechnology and Molecular Markers*, 217-227. doi:10.1007/1-4020-3213-7_15
- Qi, W., Chen, X., Fang, P., Shi, S., Li, J., Liu, X., . . . Zhang, Z. (2018). Genomic and transcriptomic sequencing of *Rosa hybrida* provides microsatellite markers for breeding, flower trait improvement and taxonomy studies. *BMC plant biology*, 18(1), 1-11. doi:10.1186/s12870-018-1322-5
- Quiala, E., Montalvo, G., & Matos, J. (2004). Empleo de la Biotecnología vegetal para la propagación de cactáceas amenazadas. *Biotecnología vegetal*, 4(4). Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/426/394>
- Ramírez, H., Rancaño-Arriola, J., Benavides-Mendoza, A., Mendoza-Villarreal, R., & Padrón-Corral, E. (2006). Influencia de promotores de oxidación controlada en hortalizas y su relación con antioxidantes. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 12(2), 189-195. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/609/60912209.pdf>
- Reed, B., Mentzer, J., Tanprasert, P., & Yu, X. (1998). Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: identification and antibiotic treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67-70. doi:10.2478/fhort-2020-0005
- Reyes-Díaz, J. I., Arzate-Fernández, A. M., & Piña-Escutia, J. L. (2018). Fuentes de sacarosa y nitrógeno orgánico influyen en la embriogénesis somática de *Agave angustifolia*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(7), 1508-1513.

- Robert, H., & Friml, J. (2009). Auxin and other signals on the move in plants. *Nature chemical biology*, 5(5), 325-332. doi:10.1038/nchembio.170%7D
- Roca, W., & Mroginski, L. (1993). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Rodríguez, E. N. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai: revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible*, 7(1), 153-170.
- Rodríguez, M. S. (2018). Propagación *in vitro* de guayusa (*Ilex guayusa*) a partir de segmentos nodales. (*Tesis de grado*). Universidad San Francisco de Quito USFQ, Quito. Obtenido de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/7968/1/141266.pdf>
- Rodríguez, M., Latsague, M., Chacón, M., & Astorga, P. (2014). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, 35(1), 111-118. doi:10.4067/S0717-92002014000100011
- Romay, G., Matehus, J., Gerstl, A., Rueda, R., & Santana, M. (2006). Almidón modificado de yuca como sustituto económico del agente solidificante para medios de cultivo de tejidos vegetales. *Interciencia*, 31(9), 686-689.
- Rout, G., Debata, B., & Das, P. (1992). In vitro regeneration of shoots from callus cultures of *Rosa hybrida* L. cv. Landora. *Indian Journal of Experimental Biology*, 30, 15-18.
- Royero, M., Vargas, T., & Oropeza, M. (2007). Micropropagación y organogénesis de *Dioscorea alata* (ñame). *Interciencia*, 32(4), 247-252. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/339/33932406.pdf>

- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., . . . Scheres, B. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell*, 99(5), 463-472. doi:10.1016/S0092-8674(00)81535-4
- Salazar, E., & Romero, C. (1997). Cultivo *in vitro* de segmentos de hojas de ajonjolí (*Sesamun indicum* L.). *Rev. Fac. Agrom.(LUZ)*, 13, 293-302. doi:https://www.revfacagronluz.org.ve/v13_3/v133z005.html
- Salazar, R., Vargas, T. E., De García, E., & Oropeza, M. (2005). Micropropagacion y organogenesis de aster ericoides cultivar "Monte Cassino". *Interciencia*, 30(5), 295-299. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/339/33910409.pdf>
- Salehi, H., & Khosh-Khui, M. (1997). A simple procedure for disinfection of 'Baby Masquerade' miniature rose explants. *Scientia Horticulturae*, 68(1-4), 145-148. doi:10.1016/S0304-4238(96)00978-8
- Sánchez-Calvo, L., & Alvarenga-Venutolo, S. (2015). Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC (uña de gato). *Revista Tecnología en Marcha*, 105-120. Obtenido de https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0379-39822015000100105
- Sandoval, J., Brenes, G., & Pérez, L. (1991). *Jose, A., & Sandoval, F. (1991). Micropropagacion de platano y banano (Musa AAB, AAA) en el CATI*. Turrialba, Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).
- Sandoval-Rangel, A., Benavides-Mendoza, A., Alvarado-Vázquez, M., Foroughbakhch-Pournavab, R., Núñez-González, M., & Robledo-Torres, V. (2011). Influencia de ácidos orgánicos sobre el crecimiento, perfil bromatológico y metabolitos secundarios en chile

- piquín. *Terra Latinoamericana*, 29(4), 395-401. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/tl/v29n4/2395-8030-tl-29-04-00395.pdf>
- San-Miguel, A., & Martin-Gil, F. (2009). Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. *Gaceta Médica de Bilbao*, 106(3), 106-113. doi:10.1016/S0304-4858(09)74661-X
- Sathyan, T., Dhanya, M., Preethy, T., Aswathy, T., & Murugan, M. (2017). Relative efficacy of some newer molecules against thrips, *Scirtothrips dorsalis* Hood (Thysanoptera: Thripidae) on rose. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(3), 703-706.
- Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta*. Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- Singh, C. R. (2018). Review on problems and its remedy in plant tissue culture. *Asian Journal of Biological Sciences*, 11(4), 165-172.
- Sinha, R. (2017). Study on rose diseases: identification, detection and cure. *International Journal of Engineering Development and Research*, 5(2), 287-295. Obtenido de <https://www.ijedr.org/papers/IJEDR1702049.pdf>
- Soni, M., Carabin, I., & Burdock, G. (2005). Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food and chemical toxicology*, 43(7), 985-1015. doi:10.1016/j.fct.2005.01.020
- Sozoranga, H., & Vélez, M. G. (2016). La floricultura en el Ecuador. *Revista Caribeña de Ciencias Sociales*.
- Squeo, F., & Cardemil, L. (2006). *Fisiología vegetal*. La Serena, Chile: Ediciones Universidad de La Serena. Obtenido de <http://www.biouls.cl/librofv/web/index03.php>

- Suárez, I. E. (2020). *Cultivo de tejidos vegetales*. Montería, Colombia: Fondo Editorial Universidad de Córdoba.
- Sun, Z.-H., Long, M.-Z., Duan, X.-M., Jia, C., Zhou, D.-H., & Zhang, Y.-Z. (2013). Tissue culture and *in vitro* flowering of *Rosa chinensis* 'Xiangbin'. *Plant Physiology Journal*, 11(22). Obtenido de http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotal-ZWSL201311022.htm
- Sutter, E., & Barker, P. (1985). *In vitro* propagation of mature *Liquidambar styraciflua*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 5(1), 13-21.
- Tacoronte, M., Vielma, M., Olivo, A., & Chacín, N. (2017). Efectos de nitratos y sacarosa en la propagación *in vitro* de tres variedades de papa nativa. *Revista Colombiana Biotecnología*, 19(2), 63-73. Obtenido de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/70160/pdf>
- Thơ, N., Khánh, N., Sang, H., Út, T., Yén, T., Luân, N., & Hương, T. (2018). Investigación sobre la generación de brotes *in vitro* de rosa azafrán (*Rosa chinensis* Jacq. Var. mínima Redh). *Revista de ciencia, tecnología y alimentación*, 15(1), 57-64.
- Tibkwang, A., Junkasiraporn, S., & Chotikadachanarong, K. (2018). Effects of cytokinin and sucrose on tissue culture of *Rosa chinensis* Jacq. var. mínima Voss. *Burapha Science Journal*, 23(2), 712-721.
- Topcuoğlu, B., & Turan, M. (2018). *Introductory Chapter: Introduction to Peat*. London, United Kingdom. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/327784342_Introductory_Chapter_Introduction_to_Peat

- Túquerres, G. (2019). Producción y comercialización de rosas (*Rosa sp.*) de los pequeños productores del cantón Cayambe, provincia Pichincha, año 2017. (*Tesis de grado*). Universidad Técnica del Norte, Ibarra.
- Uribe, M., Delaveau, C., Garcés, M., & Escobar, R. (2008). Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento in vitro de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. *Bosque*, 29(1), 58-64. Obtenido de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/bosque/v29n1/art07.pdf>
- Valdez, L., González, S., Valdez-Aguilar, L., Ramírez-Godina, F., & Benavides-Mendoza, A. (2015). Efecto de la aplicación exógena de ácido benzoico y salicílico en el crecimiento de plántulas de tomate, tomatillo y pimiento. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6, 2331-2343. Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342015001002331&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Valdez, L., González-Morales, S., & Benavides, A. (2015). Ácido benzoico: biosíntesis, modificación y función en plantas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(7), 1667-1678. Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342015000700019
- Valkova, N., Lépine, F., Valeanu, L., Dupont, M., Labrie, L., Bisailon, J.-G., . . . Villemur, R. (2001). Hydrolysis of 4-Hydroxybenzoic acid esters (parabens) and their aerobic transformation into phenol by the resistant *Enterobacter cloacae* Strain EM. *Applied and environmental microbiology*, 67(6), 2404-2409. doi:10.1128/FAEM.67.6.2404-2409.2001
- Valles, M., & Boxus, P. (1987). Micropropagation of several *Rosa hybrida* L. *Acta Horti* 212, 611-617. doi:10.17660/ActaHortic.1987.212.102

- Van, J., & Davey, J. (1979). The synthesis, transport and metabolism of endogenous cytokinins. *Plant, Cell & Environment*, 2(2), 93-106. doi:10.1111/j.1365-3040.1979.tb00780
- Vanneste, S., & Friml, J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, 136(6), 1005-1016. doi:10.1016/j.cell.2009.03.001
- Vargas, F., Rivas, C., Nursamaa, A., & Zoltan, T. (2007). Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. *Avances en Química*, 2(2), 3-15. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/933/93320202.pdf>
- Vargas-Castillo, M., & Abdelnour-Esquivel, A. (2010). Cultivo *in vitro* de *Geophila macropoda* (Ruiz & Pav. DC) a partir de embriones cigóticos. *Agronomía Mesoamericana*, 21(1), 73-83. Obtenido de https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212010000100008
- Vegas, A., Ortega, D., Gualoto, W., Paredes, E., Rebolledo, E., Quintero, L., & Ortega, J. (2016). Respuesta de la palma africana híbrido INIAP-Tenera cultivada *in vitro* según el tipo de explante y niveles de ácido naftalenacético. *Bioagro*, 28(3), 193-200. Obtenido de [http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev28\(3\)/6.%20ms%201542.pdf](http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev28(3)/6.%20ms%201542.pdf)
- Velika, B., & Kron, I. (2012). Antioxidant properties of benzoic acid derivatives against superoxide radical. *Free Radicals and Antioxidants*, 2(4), 62-67. doi:10.5530/ax.2012.4.11
- Villa, R., & Arbeláez, L. (2019). Micropropagación *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.

- Weber, K. (2005). New alternatives to paraben-based preservative blends. *Cosmetics and toiletries*, 120(1), 57-62.
- Yong, A. (2004). El cultivo del rosal y su propagación. *Cultivos Tropicales*, vol. 25, núm. 2, 53-67. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193217832008.pdf>
- Yong, J., Ge, L., Ng, Y., & Tan, S. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) Water. *Molecules*, 14(12), 5144-5164. doi:10.3390/molecules14125144
- Young, P., Hutchins, A., & Canfield, M. (1984). Use of antibiotics to control bacteria in shoot cultures of woody plants. *Plant Science Letters*, 34(1-2), 203-209. doi:10.1016/0304-4211(84)90143-3
- Youren, F., Jingyang, X., Baosheng, L., & Penghua, B. (2015). Mini review of major diseases of *Rosa chinensis* in China. *Plant diseases and Pests*, 6(3), 10-13.
- Zabala, V. (01 de Febrero de 2019). *Revista Ekos*. Recuperado el 12 de Agosto de 2020, de Ecuador es el tercer exportador mundial de flores: <https://www.ekosnegocios.com/articulo/ecuador-es-el-tercer-exportador-mundial-de-flores>

Anexos

Anexo 1. Medio de cultivo, macro y micronutrientes, vitaminas y aminoácidos del medio

MS.

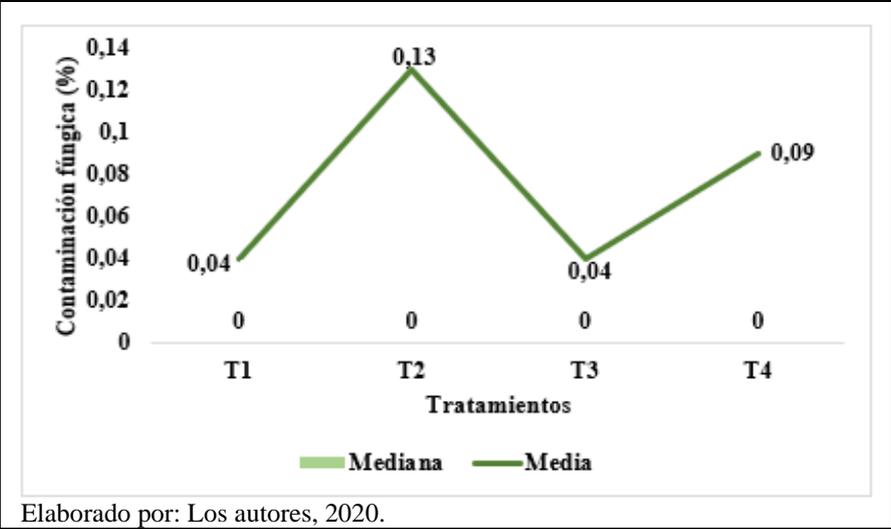
Macronutrientes	
Componentes	Medio MS (mg / L)
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1900
MgSO ₄ . 2H ₂ O	125
NH ₄ NO ₃	1650

Micronutrientes	
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,025
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,025
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	27,80
H ₃ BO ₃	6,20
KI	0,83
MnSO ₄ . 4 H ₂ O	22,30
NaMoO ₄ . 2 H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	8,60
Na ₂ EDTA	37,30

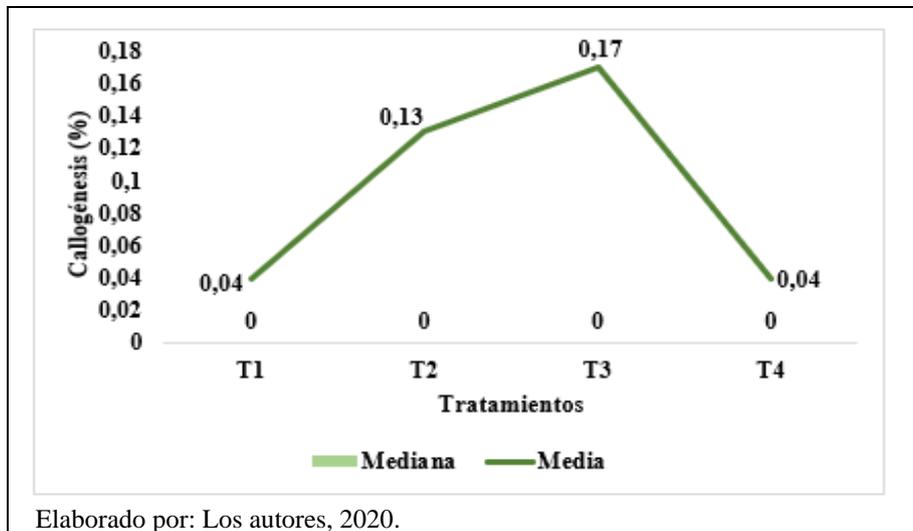
Vitaminas y aminoácidos	
Glicina	2,0
Meso-inositol	1000,0
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina HCL	0,5
Tiamina HCL	0,1

Nota. Recuperado de “Cultivo *in vitro* de plantas y sus aplicaciones en agricultura”, Pérez, J., 2006, pág. 89.

Anexo 2. Medianas y medias para la variable contaminación fúngica, durante la fase de evaluación de antimicrobianos.



Anexo 3. Medianas y medias para la variable callogénesis, durante la fase de evaluación de antimicrobianos.



Anexo 4. Medianas y medias para la variable brotación, durante la fase de organogénesis.

