

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS**

**RESPUESTA DE TRES CULTIVARES DE ROSAL (*Rosa sp.*) VARIEDADES SAMANTHA,
CRISTALINE Y PEACH, A LA MULTIPLICACION Y ENRAIZAMIENTO DE BROTES *In vitro*
EN DIFERENTES PROPORCIONES DE AUXINAS - CITOCININAS.**

TESIS

**PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
AGRONOMIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

POR

GERMAN AVIGAIL PORTILLO PAZOS

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

INGENIERO AGRONOMO

EN

**SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA
EN EL GRADO ACADEMICO DE
LICENCIADO**

GUATEMALA, MAYO DE 1999.

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA**

RECTOR

Ing. Agr. EFRAIN MEDINA GUERRA

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

DECANO	Ing. Agr. José Rolando Lara Alecio
VOCAL I	Ing. Agr. Juan José Castillo Mont
VOCAL II	Ing. Agr. William Roberto Escobar López
VOCAL III	Ing. Agr. Alejandro Arnaldo Hernández Figueroa
VOCAL IV	Br. Oscar Javier Guevara Pineda
VOCAL V	Br. José Domingo Mendoza Cipriano
SECRETARIO	Ing. Agr. Guillermo Edilberto Méndez Beteta.

Guatemala, mayo de 1999.

Señores
Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala.

Respetables Miembros:

De conformidad con las normas establecidas en la ley orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de presentar a vuestra consideración el trabajo de tesis titulado:

RESPUESTA DE TRES CULTIVARES DE ROSAL (*Rosa sp.*) VARIEDADES SAMANTHA, CRISTALINE Y PEACH, A LA MULTIPLICACION Y ENRAIZAMIENTO DE BROTES *In vitro* EN DIFERENTES PROPORCIONES DE AUXINAS - CITOCININAS.

Como requisito previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de licenciado, espero merezca vuestra aprobación.

Atentamente,



German Avigail Portillo Pazos.

ACTO QUE DEDICO

A:

DIOS

Por permitirme alcanzar esta meta.

MIS PADRES

**Angel Mario Portillo Folgar
María Leticia Pazos de Portillo**

**Como un reconocimiento a sus sacrificios,
Amor y comprensión hacia mi para lograr
este triunfo.**

MIS HERMANOS

**William Rudy, Jaannett Noemí, Ronal Wilfredo y
Angel Mario, con cariño.**

MI CUÑADO

Luis Rafael Escobar

MIS CUÑADAS

Ana Lucrecia, Damaris y Karla de Portillo.

MIS AMIGOS

**Por las experiencias inolvidables que la buena amistad
nos genera con cariño y respeto.**

ACTO QUE DEDICO

A:

GUATEMALA

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMIA

SUB ÁREA DE MANEJO Y MEJORAMIENTO DE PLANTAS

A MI ASESOR Ing. Agr. DOMINGO AMADOR PEREZ

**Por sus oportunas orientaciones en la realización
de esta investigación, las cuales hicieron posible
su culminación.**

INDICE GENERAL

i

Contenido	Página
Indice de figuras	iii
Indice de cuadros	iv
Resumen	vi
1. Introducción	1
2. Planteamiento del problema	3
3. Marco teórico	4
3.1 Marco conceptual	4
3.1.1 Historia del cultivo de rosa	4
3.1.2 Procedencia de los híbridos	4
3.1.3 Importancia económica de los híbridos	5
3.1.4 Clasificación taxonómica	5
3.1.5 Usos	5
3.1.6 Propagación tradicional en el cultivo de rosa	6
3.1.7 Aplicación importancia de la biotecnología	6
3.1.8 Historia del cultivo de tejidos	7
3.1.9 Cultivo de tejidos	7
3.1.10 Asepsia del cultivo	9
3.1.11 Enraizamiento de brotes y trasplante	10
3.1.11.1. Explante	10
3.1.11.2. El medio de cultivo	10
3.1.12 Factores físicos	13
3.1.13 Cultivo de raíces	13
3.1.14 Regeneración de plantas	14
3.2 Marco referencial	14
3.2.1 Fases para el desarrollo de un protocolo	14
3.2.2 Trabajos realizados en el cultivo de rosa	15
4. Objetivos	17
4.1 General	17
4.2 Específico	17
5. Hipótesis	18
6. Metodología	19
6.1 Lugar donde se realizó el estudio	19
6.2 Procedencia del material	19
6.3 Procedimientos generales	19
6.3.1 Colecta del material	19
6.3.2 Tipo de explante	19
6.3.3 Selección del medio de cultivo	20
6.3.4 Desinfección del material vegetativo	20
6.3.5 Siembra e incubación de los cultivos	20
6.4 Fase del desarrollo de la investigación	20
6.4.1 Fase de multiplicación de brotes	21
6.4.2 Unidad experimental	21
6.4.3 Factores que se evaluarán en la fase de multiplicación	22

6.4.4	Variables respuestas en la fase de multiplicación	23
6.4.5	Toma de datos	23
6.4.6	Modelo estadístico	23
6.4.8	Análisis de la información	24
6.4.9	Fase de enraizamiento de brotes	25
6.4.10	Factores evaluados en la fase de enraizamiento	25
6.4.11	Variables de respuestas en la fase de enraizamiento	26
6.4.12	Toma de datos	26
6.4.13	Diseño experimental	26
6.4.14	Análisis de la información	26
7.	Resultados y discusión	27
8.	Conclusiones	36
9.	Recomendaciones	37
10.	Bibliografía	48
11	Apéndice	41

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Número de brotes inducidos en la fase de multiplicación, comparación de dos tipos de explante en función de la concentración	29
2.	Número promedio de hojas por brote en la fase de multiplicación Comparación de dos tipos de explante en función de los cultivares	31
3.	Número promedio de raíces por brote en la fase de enraizamiento comparación de los dos tipos de explante en función de la concentración.	33
4.	Longitud de raíces por brote en la fase de enraizamiento, comparación de los dos tipos de explante en función de las concentración.	35

INDICE DE CUADROS

1.	Números de tratamientos para la fase de multiplicación de brotes.	21
2.	Número de tratamientos para la fase de enraizamiento de plantas en <i>Rosa sp.</i>	25
3.	Respuesta del número promedio de brotes inducidos con los dos tipos de explante de rosal a la aplicación de auxinas mas citocininas en tres variedades Samantha, Cristaline y Peach.	28
4.	Respuesta del número de hojas promedio, con los dos tipos de explante y los tres cultivares del rosal a la aplicación de auxinas y citocininas <i>in vitro</i> .	30
5.	Respuesta del número promedio de raíces, con los dos tipos de explante de rosa a la aplicación de auxinas en el medio MS con sus sales reducidas en un 50 % en tres variedades Samantha, Cristaline y Peach.	33

6	Longitud promedio de raíces, mediante la aplicación de auxinas en el medio MS con sus sales reducidas en un 50 % en tres variedades Samantha, Cristaline y Peach en <i>Rosa sp.</i>	35
7	Composición del medio basal de Muraxhige Skoog para el cultivo in vitro detegidos	42
8	Concentraciones de auxinas citocininas utilizadas en el medio MS en la multiplicación de brotes a partir de dos tipos de explante, yema apical y lateral en Rosa sp. variedades samantha, critaline y peach.	42
9	Concentraciones de auxinas utilizadas en el medio MSM Murashige Skoog Modificado con concentraciones de sales reducidas en un 50 % para la fase de Enraizamiento a partir de brotes inducidos de Rosa sp. Variedades samantha cristaline y peach en tres concentraciones de A.I.A.	43
10	Resumen del análisis de varianza para la variable número de brotes inducidos en nueve diferentes concentraciones de auxinas citocininas con dos tipos de explante en rosa sp. Variedades samantha cristaline y peach	43
11	Prueba de medias tukey para la interacción explante por concentración de la variable número de brotes inducidos en nueve diferentes concentraciones de auxinas citocininas con dos tipos de explante en rosa sp. Variedades samantha, cristaline y peach	44
12	Resumen del análisis de varianza para la variable número de hojas por brote en nueve diferentes concentraciones de auxinas citocininas con dos tipos de explante en rosa sp. Variedades samantha, cristaline y peach.	44
13	Prueba de medias para la interacción cultivar por explante de la variable número de hojas por brote en nueve diferente concentraciones de auxinas citocininas con dos tipos de explante en rosa sp. Variedades samantha, cristaline y peach	45
14	Resumen del análisis de varianza para la variable número de raíces por brote en diferentes concentraciones de auxinas citocininas con dos tipos de explante en rosa sp. Variedades samantha, cristaline y peach.	45
15	Prueba de medias tukey para la interacción cultivar por explante por concentración de la variable número de raíces por brote en tres diferentes concentraciones de auxinas con dos tipos de explante en rosa sp. Variedades samantha. Cristaline y peach	46
16	Resumen del análisis de varianza para la variable longitud de raíces por planta en tres diferentes concentraciones de auxinas con dos tipos de explante en rosa sp. Variedades samantha, cristaline, y peach.	46

17	Pruebas de medias tukey para la interacción cultivar por explante por concentración de la variable longitud de raíces por brote en tres diferentes concentraciones de auxinas con dos tipos de explante en rosa sp. Variedades samantha, cristaline y peach	47
18	pasos que se siguieron en el proceso experimental desde la obtención de los explantes hasta la fase de enraizamiento de Rosa sp.	47
19	Abreviaturas utilizadas en el trabajo	48
20	Tabla de toma de datos en la fase de multiplicación de brotes	49
21	Tabla de toma de datos de la fase de enraizamiento.	52

RESPUESTA DE TRES CULTIVARES DE ROSAL (*Rosa sp.*) VARIEDADES SAMANTHA, CRISTALINE Y PEACH, A LA MULTIPLICACION Y ENRAIZAMIENTO DE BROTES *In vitro* EN DIFERENTES PROPORCIONES DE AUXINAS - CITOCININAS.

RESPONSE OF TREE CULTIVARES TYPES OF ROSE TREE CULTIVATION (*Rosa sp.*) SAMANTHA VARIETIES, CRISTALINA AND PEACH FOR THE MULTIPLICATION AND TAKING ROOT IN DIFFERENT PROPORTIONS OF AUXINAS AND CITOCININAS.

RESUMEN

Con el fin de establecer la micropropagación de rosal (*Rosa sp.*) se estableció esta investigación con los objetivos de lograr la multiplicación y enraizamiento de brotes a partir de yemas apicales y laterales de *Rosa sp.* Variedades Samantha, Cristaline y Peach.

La rosa, es una planta ornamental y usada fundamentalmente en Guatemala como flor de corte, para arreglos florales y jardinería. Los agricultores guatemaltecos que se dedican a su reproducción y exportación, importan la plántula producida bajo condiciones específicas de invernadero, que para una producción a gran escala representa inversiones de muchos recursos monetarios, físicos y humanos. En la actualidad la plántula importada tiene un costo de US\$.5.00 dólares aproximadamente. Para evitar la importación de este material valioso los agricultores han requerido de estudios sobre micropropagación de esta planta.

El trabajo se dividió en dos fases, la primera referente a la multiplicación de brotes a partir de explantes de yemas apicales y laterales. La segunda, referente al enraizamiento de los brotes obtenidos en la primera fase. En esta primera fase, se utilizó como medio de cultivo, el medio de Murashige-Skoog 1,962, MS con diferentes combinaciones de auxinas – citocininas. Para la fase de enraizamiento, se

utilizó como medio de cultivo el Murashige – Skoog Modificado MSM con las concentraciones de sales reducidas en un 50 % más sucrosa al 1 % en presencia del ácido indolacético en concentraciones de 0.1, 0.3 y 0.5 mg/l. Los experimentos de multiplicación de brotes y enraizamiento se instalaron bajo un diseño completamente al azar con un arreglo trifactorial. Las variedades de respuesta en la fase de multiplicación de brotes fueron número de brotes y número de hojas por brote; y para la fase de enraizamiento de los mismos fueron número de raíces por brote y longitud de raíces.

Los principales resultados muestran que las variedades de rosa Samantha, Cristaline y Peach responden a la micropropagación *in vitro*. En la fase de multiplicación los cultivares Cristaline y Peach presentaron mayor número de hojas y brotes al tratarlas en un medio líquido de inducción MS suplementado con auxinas – citocininas en concentraciones de ANA 2.5 mg/l mas BAP 2.5 mg/l con los dos tipos de explante apical y lateral, reportando de 2 a 3 brotes laterales por explante, el ensayo se realizó en 8 semanas.

Para la fase de enraizamiento los tres cultivares, con los dos tipos de explante presentaron de 2 a 3 raíces por explante al tratarlas con medio líquido de inducción MSM. Para esto se utilizó el medio MSM al 50 %, suplementado con auxinas (ácido indolacético) en dosis de 0.1 mg/l, 0.3 y 0.5 mg/l. El experimento se realizó en 4 semanas.

1. INTRODUCCION.

El incremento del cultivo de plantas ornamentales en Guatemala ha venido adquiriendo importancia debido al potencial económico que representa como consecuencia de la creciente demanda de productos de agroexportación. Según estudios realizados se considera que los bastiones en los que se cimienta la economía del país actualmente, y por lo que se genera la mayor cantidad de divisas son: entre exportaciones de hortalizas y ornamentales.

En Guatemala, la producción de rosas durante los últimos años ha obtenido importancia debido a la demanda de flor de corte que plantean los mercados internacionales. En consecuencia, se considera que Guatemala ocupa el tercer lugar después de Colombia y Ecuador como productor y exportador de rosas.

Muchas de las variedades de rosa han resultado de hibridaciones interespecíficas y son consideradas como rosa híbrida, aunque la hermosura y encanto de las especies silvestres motivan a ser cultivadas en jardines, los cultivares híbridos tienen la atracción para ser propagados en forma masiva.

El cultivo de la rosa presenta algunos problemas el más significativo de ellos es la propagación de las plantas. Para solventar el problema, los productores de flor importan las plántulas enraizadas de los Estados Unidos.

La micropropagación, es una técnica ampliamente utilizada para propagar plantas cuya propagación sexual o asexual se dificulta por las características particulares del material o porque se requieren condiciones ambientales específicas. La utilización de la micropropagación *in vitro* desde sus inicios plantea una serie de ventajas, como lo es la alta eficiencia en la multiplicación de individuos superiores libres de patógenos, pues a partir de explantes o porciones de tejidos de material genético mejorado se obtiene una descendencia masiva que genera una gran cantidad de plantas completas con alta calidad fitosanitaria.

Esta investigación se realizó con el objetivo de lograr la multiplicación de brotes a partir de yemas apicales y laterales de *Rosa sp.* variedades Samantha, Cristaline y Peach. Este estudio, contempló dos fases principales: la primera, referente a la multiplicación de brotes a partir de los explantes yema apical y

lateral. La segunda fase, el enraizamiento de los brotes obtenidos en la primera fase. En la fase de multiplicación, utilizó como medio de cultivo el medio de Murashige - Skoog 1,962, con diferentes combinaciones de auxinas y citocininas. Para la segunda fase de enraizamiento, se utilizó como medio de cultivo el de Murashige - Skoog Modificado con las concentraciones de sales reducidas en un 50% más sucrosa al 1% en presencia del ácido indolacético (AIA). En concentraciones de 0.1, 0.3 y 0.5 mg/l. Los experimentos de multiplicación de brotes enraizamiento se instalaron bajo un diseño completamente al azar con un arreglo trifactorial.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La rosa, es una planta ornamental usada fundamentalmente en Guatemala como flor de corte, para arreglos florales y jardinería. Los agricultores guatemaltecos que se dedican a su reproducción y exportación, importan la plántula producida bajo condiciones específicas de invernadero, que para una producción a gran escala representa inversiones de muchos recursos monetarios, físicos y humanos. En la actualidad la plántula importada tiene un costo de USA. \$5.00 dólares. Tradicionalmente se ha venido utilizando la propagación por injerto, aunque este procedimiento ya data de varias décadas de haberse implementado, su eficiencia es muy baja. Con injertadores expertos el porcentaje de éxito oscila entre el 15 y 30% (comunicación personal con injertadores de rosa). En algunos invernaderos se logra enraizar las variedades mejoradas y se maneja sin depender del proceso de injertación, esto significa, que es posible evaluar procedimientos que permitan propagar las variedades mejoradas sin depender del proceso de injertación. A través de la micropropagación es posible incrementar la tasa de propagación de rosa híbrida a partir de explantes provenientes de órganos vegetales sanos y exuberantes. Se ha encontrado en este tipo de propagación una herramienta versátil en donde se puede multiplicar en forma masiva un cultivar seleccionado.

3. MARCO TEORICO.

3.1 Marco conceptual

3.1.1. Historia del cultivo de rosa

La rosa (*Rosa sp.*) Es originaria de la China, se habla de ella desde hace más de 4,000 años. En un proceso de expansión la rosa llega a la India, Persia, Grecia, Italia y España, países que conocieron la rosa a todo lo largo de su historia. No obstante, durante aquella época la historia de la rosa es oscura, hasta el punto de poder decir que no salió de una era primitiva y elemental. (21, 28).

A principios del siglo XIX, la Emperatriz Josefina de Francia, mandó a recolectar por toda Europa, todas las variedades de rosas conocidas en aquel entonces y formó los famosos jardines de rosas en el palacio de Mulmaison. Fue a partir de ese momento que el cultivo de la rosa recibió el estímulo que habría de convertirla en la flor más popular del mundo. (1).

En 1815, Francia se puso a la vanguardia de este cultivo. Diez años después ya se conocían más de 5,000 variedades. Posteriormente, las rosas fueron traídas a América por hispanos sajones. Las variedades modernas de rosas se originaron de los cruces entre las especies de rosa indica, rosa sinesis, rosa rugosa, rosa multiflora y rosa laxa. A raíz de lo anterior tenemos en la actualidad las clases de rosas floribundas, gradifloras, miniaturas, trepadoras, arbustivas y tea híbrido; estas últimas son utilizadas en explotaciones comerciales. Y hoy en día se ha extendido el cultivo de tal forma, que en los Estados Unidos ocupa el primer lugar entre las exportaciones de flores de corte. En nuestro país comercialmente ocupa el tercer lugar entre este tipo de flores. (21, 28).

3.1.2. Procedencia de los híbridos

Los productores de flor importan las plántulas enraizadas de otros países como lo es EE.UU., Ecuador y Colombia. Los precios fluctúan entre 2.50 y 5.00 dólares por planta aproximadamente (Banco de Guatemala).

3.1.3. Importancia económica de los híbridos

En Guatemala, la producción de rosas durante los últimos años ha venido cobrando importancia, debido a la demanda de flor de corte que plantean los mercados internacionales. En consecuencia, se

considera que Guatemala ocupa el tercer lugar en Latinoamérica después de Colombia y Ecuador como productor y exportador de rosa. La exportación de rosas genera el 1.63% de las divisas totales que ingresan al país, lo que se traduce a un promedio anual de \$15,789.000, a nivel de productos no tradicionales. El cultivo de rosa generó el 22.15% de las divisas que ingresaron durante el año de 1996, correspondiendo a \$7,266.000.(Banco de Guatemala)

3.1.4 Clasificación taxonomica (7)

División: Magnoliophita o Angiospermas

Clase: Magnoliopsida o Dicotiledoneas

Sub-Clase: Rosidae

Orden: Rosales

Familia: Rosaceae

Género: Rosa

Especie: híbrida

Nombre Científico: *Rosa sp.*

3.1.5 Usos.

La rosa, es una planta ornamental de gran utilidad en jardines por su vistosidad y decoración, muy comercializada en mercados de flores y floristerías. Tanto la rosa como otras ornamentales son cultivadas en jardines o en invernaderos en diversas formas y se ha especializado en los mercados nacionales e internacionales como flor de corte. La rosa también se encuentra dentro de la farmacopeas Europeas ya que tanto su parte floral la utilizan para aceites, fragancias y son utilizadas en la industria farmacéutica.

(21)

3.1.6 Propagación tradicional en el cultivo de la rosa

Es posible su propagación por semilla en especies originales y únicamente la realizan los genetistas. Una desventaja que tiene la utilización de la semilla, es que tarda mucho tiempo para poder florecer, más de un año. (21)

Se puede propagar vegetativamente por injerto, vástago y acodo. El método de injertación que se realiza en el rosal es el de yema o escudete el que se hace en el cuello de la raíz, lo más bajo posible. También puede realizarse directamente sobre el tallo, a 10 ó 20 Centímetros de la base del suelo. (21)

3.1.6. Reproducción por Vástago (estaca)

Esta forma de reproducción, consiste en cortar partes de tallos de la misma planta y sembrarlos, los cuales después de cierto tiempo emitirán raíces y darán origen a nuevas plantas con las mismas

Características de la planta madre. El acodo, es otra de las formas de reproducción asexual aun sirve para fijar las características de una variedad de rosal específica. (21)

3.1.7. Aplicación e importancia de la biotecnología en el desarrollo agrícola

Según Vázquez, Carrillo y Mejía (23), la biotecnología es un conjunto de técnicas que incluyen la manipulación de organismos o parte de ellos con el fin de integrarlos al proceso de producción; la cual basa su desarrollo en importantes descubrimientos y estudios hechos en las ciencias biológicas como la Fisiología Vegetal y la Genética.

Los estudios desarrollados sobre genética molecular por O.T. Avery (1944) y por Jim Watson y Francis (1951) acerca de la estructura y composición del material genético permitió darle solidez científica al término acuñado por Morgan (1901) de Totipotencia Celular, refiriéndose a la capacidad que tiene una célula de desarrollar por regeneración un organismo completo. (24).

En general, se puede afirmar que la importancia de esta técnica radica en que a medida que en su conjunto se integren por grupos multidisciplinarios en el cultivo, se hacen más eficientes los sistemas productivos en general. Por citar un ejemplo, en Inglaterra en 1968 fueron propagadas con un escaso número de patrones, más de un millón de plantas con genotipos de alta productividad de manzana y melocotón en un período de un año, lo cual hubiera sido técnicamente imposible por cualquier técnica de propagación convencional. (24)

En Guatemala, cuyo sustento económico es la actividad agrícola, es de esperarse que la biotecnología alcance una gran aplicación, sustentado principalmente en el mejoramiento genético de

cultivos de exportación, basándose principalmente en las técnicas más sencillas y de menores volúmenes de inversión como el cultivo *in vitro* de puntas meristemáticas. (8)

3.1.8. Historia del cultivo de tejidos

La técnica de generar plantas nuevas en un medio de crecimiento artificial y en condiciones asépticas, se inició con investigaciones sobre fisiología vegetal con técnicas microbiológicas. Asimismo, estas investigaciones tomaron auge cuando Sacks en 1860 y Knops en 1861 observaron que los principales nutrientes de las plantas eran compuestos orgánicos, para lo cual prepararon una solución que contenía una mezcla de ellos; esta mezcla fue utilizada posteriormente por casi todos los investigadores que siguieron trabajos con tejidos vegetales. (13).

En el período comprendido entre los años 1934 - 1939, White cultivó raíces de tomate *in vitro* agregando al medio extractos de levadura y vitaminas, y juntamente con otros colaboradores, Gautheret y Nobecout, iniciaron el crecimiento de callo en un medio sintético. (27)

En la década de los años 1950 y 1960, Skoog identificó a la cinetina y reconoció su función como regulador en la iniciación de la división celular. En 1962, Murashige y Skoog desarrollaron un medio nutritivo con el que lograron crecimiento rápido de tejidos en tabaco. Este medio es ampliamente utilizado en el cultivo *in vitro* actualmente. (13)

3.1.9 Cultivo de tejidos

La técnica de cultivo *in vitro* se basa en el cultivo de explantes de plantas en medios sintéticos en condiciones controladas, con el objeto de proveer al explante un medio similar al que tendría en condiciones naturales. Esta técnica se desarrolló a partir de la explicación del proceso de la totipotencia. (13, 14, 17).

La totipotencia, se ha definido como la capacidad de una célula de desarrollar a un individuo completo, basado en que toda célula contiene la información genética necesaria para reconstruir todas las partes de la planta y sus funciones. (14, 15).

Las posibilidades de aplicación del cultivo de tejidos se han resumido de la siguiente manera.(13)

a) Estudios básicos sobre fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines.

- b) Bioconversión y producción de compuestos útiles.
- c) Incremento a la variabilidad genética.
- d) Obtención de plantas libres de patógenos.
- e) Propagación de plantas
- f) Conservación e intercambio de germoplasma. (13).

La técnica de cultivo de tejidos ha desarrollado las siguientes metodologías: (13, 14).

El cultivo de protoplastos.

Transferencia de genes.

- Regeneración de embriones.

Cultivo de endospermo.

Cultivo de granos de polen.

- Cultivo de primordios florales.

Cultivo de meristemos apicales y laterales

Cultivo de embriones.

Cultivo de cotiledones.

- Cultivo de hipocotilos.

- Cultivo de tallos.

Cultivo de hojas.

Cultivo de raíces.

Cultivo de inflorescencias y pétalos.

Mediante el cultivo de tejidos vegetales, se puede estudiar diferentes fenómenos morfogenéticos que ayudan a entender cuáles son los factores fundamentales que intervienen en la morfogénesis y diferenciación de partes aisladas de la planta, que están fuera de la influencias correlativas del resto de la misma. (13).

Las ventajas que ofrece el cultivo de tejidos *in vitro* pueden resumirse en las siguientes.(13)

1) Menor tiempo en la obtención de resultados

- 2) Mejores características de las plantas propagadas
- 3) Comercialización rápida de una nueva variedad
- 4) Obtención masiva de clones.
- 5) Propagación de plantas cuyas condiciones normales de multiplicación sean largas y difíciles.
- 6) Revisión en la planificación de las siembras.
- 7) Ausencia de infecciones y factores climáticos adversos.

3.1.10. Fases de la Micropropagación

Existen tres pasos importantes, que deben tomarse en cuenta en la micropropagación según lo propuesto por Murashige en 1974. (15).

3.1.10.1 Asepsia del cultivo.

Los medios de cultivo pueden provocar la proliferación de micro organismos en donde pueden crecer y desarrollarse compitiendo con el cultivo, es por eso que es necesario que todos los explantes estén debidamente limpios y desinfectados. Las sustancias más comunes para desinfectar los explantes son: el hipoclorito de sodio o de calcio, el peróxido de hidrógeno y el cloro comercial, alcohol en diferentes concentraciones. (14, 15, 25).

3.1.10.2. Multiplicación

En esta etapa sucede la formación de nuevas células por división, o por aumento de tamaño. Esta etapa esta influenciada por las condiciones *in vitro* y la ganancia en peso seco y da como resultado la diferenciación celular de nuevo. (15).

3.1.10.3 Enraizamiento de brotes y transplante

Para esta etapa, se debe trasladar el cultivo a otro medio con menos cantidad de sales inorgánicas y cambios en el balance hormonal, es decir, disminuir las citocininas y aumentar las auxinas. La última etapa de la micropropagación es el período de endurecimiento o aclimatación en la cual la planta debe colocarse en condiciones normales para su desarrollo total, para lograr esta fase se debe lavar la planta y eliminar los restos del medio de cultivo que pudieran quedar en las raíces y luego

sembrarlas en suelo estéril, cubriéndolas con bolsas plásticas a las cuales se le abrirán agujeros para ser aclimatadas poco a poco a su nuevo hábitat. (15).

3.1.11. Factores que influyen en la micropropagación

3.1.11.1. Explante

La selección del explante depende del estudio a realizar y la especie vegetal analizada para la inducción de callo, muchas partes de la planta pueden ser utilizadas, ya que estas poseen numerosas células que permiten la proliferación callosa. En otros casos pueden influir otros factores como la disponibilidad del material con fácil manipuleo, homogeneidad, poca contaminación, rápida respuesta *in vitro*, etc. (15).

3.1.11.2 El medio de cultivo

Es una solución que contiene sales minerales, elementos orgánicos, como vitaminas, aminoácidos, y algún carbohidrato, así como reguladores del crecimiento. (15).

El medio de cultivo es uno de los factores de los que depende en gran parte el éxito del cultivo *in vitro* por su influencia y regulación en procesos como la morfogénesis y el crecimiento de los tejidos cultivados. (15).

A través del tiempo, paralelo al desarrollo y perfeccionamiento de la técnica del cultivo de tejidos, se han establecido diferentes medios de cultivo. (15).

De la misma manera, se definió la especificidad de medios de cultivo, pues se puede afirmar que para cada género, incluyendo diferentes explantes que provienen de la misma planta, tienen diferentes requerimientos para crecer en óptimas condiciones. (15).

Estos medios básicos se han denominado generalmente con el nombre de las personas que los desarrollaron. Los primeros medios fueron establecidos con base en las soluciones nutritivas para cultivos hidropónicos de Knopp y Pfeffer. (15).

El medio formulado por Murashige y Skoog se ha utilizado con mucho éxito en especies, a veces con ligeras modificaciones, siendo probablemente el medio más utilizado en la actualidad. (15)

Casi todos los medios de cultivo utilizados hasta ahora contiene entre 15 y 35 compuestos que se pueden agrupar dependiendo de su naturaleza química, en los siguientes grupos afines.

a) Sales inorgánicas.

Estas sustancias proporcionan los macro y microelementos que la planta necesita para un desarrollo normal, las cuales pueden ser preparadas en soluciones concentradas y guardadas en refrigeración. (16)

b) Compuestos orgánicos

Como ya se ha indicado, comprende a las vitaminas, reguladores de crecimiento, carbohidratos, principalmente. (16).

c) Vitaminas

Son requeridos en pequeñas cantidades y actúan como catalizadores metabólicos. La única vitamina que se ha demostrado que tiene importancia en el cultivo de células y órganos vegetales es la tiamina, en concentraciones de 0.1 a 0.3 mg/l; así mismo, se han utilizado otras vitaminas, debido a que pueden estimular procesos de crecimiento específico. (15).

d). Reguladores del crecimiento

El crecimiento de las plantas está controlado por procesos fisiológicos que a su vez se manejan por la intervención de varios compuestos orgánicos llamados hormonas, que se producen en el interior del vegetal. (16).

En el campo de la propagación *in vitro* se emplean reguladores del crecimiento, fundamentalmente los llamados promotores del crecimiento, como las Auxinas, Citoquininas y Giberelinas. (16).

Las citoquininas y las auxinas son utilizadas en concentraciones que varían según la especie, pero generalmente las primeras se utilizan en concentraciones de 0.03 a 30 mg/l, en tanto las Auxinas a razón de 0.1 a 10 mg/l. (16).

Se sabe que las auxinas contribuyen a la elongación celular y las que más se utilizan dentro de este grupo son: el ácido indolbutírico (AIB) y el ácido naftalenacético (ANA), en tanto que las citoquininas promueven la división celular y la organización de callo, utilizándose entre ellas más comúnmente la benciladenina (BA) y la cinetina. (16).

e) Carbohidratos

Todos los tejidos vegetales en cultivo requieren de fuente de energía en los medios. La sucrosa y la D-glucosa son agregadas usualmente en concentraciones de 20,000 a 30,000 mg/l, aunque concentraciones más elevadas pueden resultar satisfactorias para otros propósitos. Casi todos los cultivos parecieran tener una respuesta óptima en cuanto al crecimiento, con la presencia de un disacárido, mientras que podría existir una variabilidad más considerable en el crecimiento si otros disacáridos o monosacáridos son sustituidos por la sucrosa. (12, 16).

La elección del azúcar y la concentración a utilizar va a depender del tejido a cultivar y del propósito del estudio. (12).

f). Complejos naturales

El objetivo del cultivo de tejidos ha sido procurar definir los componentes de un medio dado, para así eliminar el uso de los extractos naturales crudos.

Aunque esta medida es recomendada desde un punto de vista científico, el uso de tales extractos no debe ser ignorada cuando las mezclas químicas definidas fracasan al producir los resultados esperados. (12).

Los productos más utilizados son la pulpa de plátano, agua de coco, emulsión de pescado, jugo de naranja, extracto de malta, jugo de tomate, extracto de levadura, entre otras. (12).

g). Materiales inertes

Dentro de ellos, se ha utilizado el agar, pues proporciona un medio de soporte excelente para el tejido. Otros medios se pueden formar con otros compuestos como la poliacrilamida y la sílica gel. Cuando el medio es líquido, se usa de soporte papel filtro (13).

h). Suplementos no definidos

El carbón activado es adicionado al medio nutritivo principalmente para remover toxinas presentes en el agar, o desperdicios aromáticos excretados por los mismos tejidos en cultivo. También absorbe moléculas aromáticas preferentemente sobre las cadenas largas y mientras más larga sea la molécula, más

fuerte será la absorción. El carbón activado previene la marchitez de los tejidos y estimula la embriogénesis y el enraizamiento, aunque se ha reportado que puede reducir el enraizamiento. (12).

3.1.12. Factores físicos

Entre los factores físicos de mayor importancia están la luz y la temperatura, ya que contribuyen al desarrollo de los cultivos. La luz juega un papel decisivo en lograr la organogénesis debido a la acumulación de almidón en las células durante la fotosíntesis. Se ha indicado también que la luz en algunos procesos como diferenciación, donde se involucra el fotoperíodo, afecta la formación de yemas; períodos cortos o largos de luz reducen la diferenciación de yemas. El fotoperíodo puede estar influenciado por cambios internos hormonales (auxinas, citoquininas). (3).

Se ha determinado que la intensidad lumínica afecta el tipo de crecimiento del explante; así se asocia la producción de fenoles, la inhibición del crecimiento de callo con intensidades de luz alta. Por último, la longitud de onda corta es crucial para el cultivo *in vitro* ya que los pigmentos asociados con la fotosíntesis tienen sus espectros de absorción en las longitudes de onda del rojo y del azul, de ello proviene la diversidad de lámparas con luces apropiadas para el cultivo *in vitro*. (3).

3.1.13. Cultivo de raíces

Kott y Robinson, fueron los pioneros de esta técnica ya que en 1922 reportaron crecimiento limitado de los ápices provenientes de raíces de plántulas de trigo (*Triticum sativum*). White en 1934 cultivo ápices aislados de raíz de tomate (*Lycopersicum esculentum*) Por un tiempo indefinido y utilizando un medio líquido. (13).

Las concentraciones que se han obtenido del cultivo de raíz se han inclinado en nuevos descubrimientos a la fisiología vegetal, por lo que se conoce ahora más sobre el metabolismo de los carbohidratos, el papel de iones minerales, vitaminas y hormonas en lo que se refiere al crecimiento vegetal y en el proceso de diferenciación y desarrollo de raíces. (13).

3.1.14. Regeneración de plantas

La regeneración de plantas que se cultivan *in vitro* se puede lograr mediante dos caminos: directamente de los explantes y a partir de callos. Se puede generar plantas a través de la organogénesis

que incluye el desarrollo de yemas o meristemas radicales a partir de explantes directamente o bien a partir de callo; también se puede generar plantas a partir de embriogénesis somática, o sea la producción de embriones a partir de células que no deriven la fusión de gametos. (14).

Existe un factor muy importante en la regeneración de la planta a partir de callos, y esta es la del fenómeno de habituación en el cual los callos que se mantienen en condiciones indiferenciados por largos períodos limitan su capacidad morfogénica. (14).

3.2. Marco Referencial

3.2.1. Fases para el desarrollo de un protocolo

El desarrollo de la fase inicial de un protocolo consiste en el establecimiento y desarrollo del explante para lo cual la mayoría de textos define cinco pasos que son los siguientes.

- a) Definición de la técnica a utilizar: De acuerdo a esto el tipo de técnica a utilizar debe estar orientada al objetivo que persigue la propagación, por ejemplo para la propagación de clones y conservación de germoplasma son adversas aquellas técnicas que inducen a la formación de callo porque generan variabilidad. (14).
- b) Definición del tipo de explante: El tipo de explante a utilizar debe de estar orientado a la facilidad maniobrarlo y a la disponibilidad del mismo, además que se debe tomar en cuenta que no cualquier explante responde a un tipo de técnica definida. (19).
- c) Técnica de desinfección. La técnica de desinfección debe estar destinada a reducir al mínimo la contaminación del explante durante la manipulación del mismo evitando al máximo el daño al tejido causado por la acción de los agentes desinfectantes. (19).
- d) El medio de propagación: En cuanto a la definición del medio se señala que existen varios medios básicos utilizados para la propagación de plantas entre los que destacan el Medio de Murashige y Skoog, Gamborg, White, entre otros. (19).

Sin embargo, es el manejo de la interacción hormonal el que limita y condiciona en la mayoría de los casos el tipo de respuesta y desarrollo del explante, por lo que es en base a ello que se diseñan las

principales modificaciones a estos para el desarrollo de la investigación inicial que pretende la formación de un protocolo.

e) Condiciones de cultivo: Generalmente para la mayoría de los casos se sugiere fotoperíodos de 6 horas con intensidad de 1,000 Lux y una temperatura de 25 grados Centígrados. (19).

3.2.2. Trabajos realizados en el cultivo de rosa

Burgarín, M.R. y H. Lozoya. (6). Evaluaron el efecto de tres fuentes de carbono (sacarosa, glucosa y azúcar comercial,) y tres grosores de inoculo inicial en tres cultivares de rosal tanto en la etapa de brotación, como en el primer incremento (cuatro semanas de incubación en cada una). El desarrollo vegetativo se analizó bajo un diseño experimental de 27 tratamientos completamente al azar y arreglo factorial múltiple. La diferenciación de la primera etapa se vio favorecida por el azúcar comercial y por el mayor diámetro del explante en los tres cultivares. (6).

Burgarin, M.R.; H. Lozoya (6). Con el fin de establecer la micropropagación del rosal (*Rosa X noisettiana cv. "Manettii"*), estableció un ensayo utilizando como inoculo inicial segmentos de tallo con una yema axilar para evaluar los efectos de dos medios de cultivos previamente reportados (Hasegawa,1979 y Davies,1980) con dos agentes solidificantes (Agar 0.8 y 0.6% ó Gelrite, 0.2%). Se obtuvieron diferencias significativas entre medios más no para agentes solidificantes respecto a brotes desarrollados, destacando el Davies con 3.2 brotes por inóculo. En la fase de multiplicación, la diferencia de incrementos no fue significativa entre los medios (1.9 a 3.15 brotes por inoculo), pero sí superaron al testigo (1.31 brotes), el cual creció en el medio basal MS, suplementado en mg/l con: tiamina -HCl; 0.5; piridoxina - HCl; 0.5 ; ácido nicotínico 0.5; glicina, 2.0; i-inositol, 100; sacarosa 30,000 y agar 8000. El ácido indolacético a 0.1 mg/l promovió rizogénesis en todos los individuos a los 21 días, mientras que con AIB y ANA a 0.3 mg/l solo fue de 83 a 75% respectivamente. Reduciendo hasta 0.25 la concentración de sales minerales MS, en presencia de 0.1 mg/l de AIA , también aceleró la iniciación de raíces.

Torres Montoya, E.R. (23) con el objetivo de encontrar las mejores condiciones *in vitro* para el enraizamiento de *Rosa hybrida L. Cultivar royalty*, implementó tres ensayos secuenciales variando la

concentración de sales básicas de Murashige- Skoog (MS). Concentración de ácido indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (AIB), diversas concentraciones de sacarosa y dos edades de brotes. El AIB superó al AIA en rizogénesis. En general, la mejor combinación de factores fue un medio con sales MS a la mitad, suplementadas con 0.3 mg/l de AIB, 20 g/l de sacarosa y 6 g/l de agar, tomando como inóculo brotes desarrollados *in vitro* por seis semanas.

4. OBJETIVOS.

4.1. General

- Evaluar la respuesta de explantes de yemas apicales y laterales de *Rosa sp.* a la multiplicación de brotes y enraizamiento de los mismo *in vitro* en los cultivares, Samantha, Cristaline y Peach, utilizando diferentes concentraciones de auxinas y citocininas en el medio de cultivo.

4.2. Especifico.

- 1- Determinar el cultivar de *Rosa sp.* que presenta el mayor porcentaje de brotes *in vitro*, en *Samantha, Cristaline y Peach.*
- 2- Determinar el tipo de explante de *Rosa sp.* que presenta el mayor porcentaje de brotes *in vitro* en los cultivares.
- 3- Determinar la concentración de auxinas y citocininas que maximice la multiplicación de brotes *in vitro* de los cultivares de *Rosa sp.* evaluada.
- 4- Determinar el cultivar, tipo de explante y concentración de auxinas que permitan obtener el mayor número de raíces *in vitro* en los tres cultivares.

4. HIPOTESIS.

- 1- El cultivar Samantha reportará mayor porcentaje de brotes que los cultivares Cristaline y Peach.
- 2- El explante apical reportará mayor porcentaje de brotes que el explante lateral en *Rosa sp.*
- 3- La combinación hormona auxinas citocininas 0.1 – 0.5 mg/l promoverá en forma masiva la multiplicación de brotes en *Rosa sp.*
- 4- El cultivar Samantha formará mayor número de raíces en relación al resto de los cultivares en *Rosa sp.*

6. METODOLOGIA.

6.1. Lugar donde se realizo el estudio.

Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Area Tecnológica, Subárea de Manejo y Mejoramiento de Plantas.

6. 2. Procedencia del material vegetal

El material fue colectado en la finca Alegría, en la aldea Chimachoy del municipio de San Andrés Itzapa, Chimaltenango, a 80 km. de la ciudad capital. Se ubica en la zona ecológica, bosque húmedo montano bajo sub-tropical, con suelos perteneciente a los grupos de procedencia volcánica, series Patzicía, Tecpán y Alotenango. El material madre es ceniza volcánica, relieve inclinado, textura franco arcilloso con espesor de 25-40 cm. El clima de la región es templado con invierno benigno húmedo, la temperatura media oscila entre los 8 y 14°C, la precipitación media es de 750 mm. de mayo a octubre.

(20)

6.3. Procedimintos Generales

6.3.1. Colecta del material

El material fue colectado en una plantación comercial en crecimiento entre cuatro y cinco años de edad.

La colecta de los dos tipos de explantes a utilizar se realizaron en horas de la mañana, en los invernaderos de la finca Alegría. Los explantes fueron seleccionados tomando materiales sanos, jóvenes, exuberantes y con características fitosanitarias fácilmente observables. Las yemas apicales fueron extraídas de un tamaño aproximadamente uniforme de 10 mm. y las yemas laterales con un grosor aproximado de 1 a 5 mm. El material fue protegido con papel toalla humedecido con agua esterilizada, luego fue depositado en una hielera para transportarlo al laboratorio.

6.3.2. Tipo de explante

Se tomaron dos diferentes tipos de explantes, yemas apicales y laterales, se eligieron estos tipos de explantes por tener zonas de crecimiento activo ya que son materiales jóvenes, sanos y exuberantes.

6.3.3. Selección del medio de cultivo

El medio basal que se utilizó fue (MS) Murashige & Skoog suplementado con sacarosa 30 g/l y agar 8 g/l. Esta etapa consistió en la preparación de las soluciones madres basadas en concentraciones descritas para el medio MS (Cuadro 7) conteniendo macro elementos, myo-inositol, solución de hierro y vitaminas.

De estas soluciones madres fueron extraídos los volúmenes requeridos para la elaboración de las mezclas adicionándose la dosis preestablecidas de auxinas y citocininas, luego los medios fueron suplementados con sacarosa 30 g/l. solidificado con agar 8 g/l. Los medios fueron colocados en el autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 121 grados centígrados para su esterilización, para la fase de multiplicación de brotes y la fase de enraizamiento.

6.3.4. Desinfección del material vegetativo

Las yemas tanto apicales como laterales, se colocaron en un frasco de vidrio de 120 ml. con agua destilada y se procedió a desinfectarlas con unas gotas de hipoclorito de sodio, agua estéril y jabón líquido durante 20 minutos. Inmediatamente después se desinfectaron con alcohol al 70% durante 3 minutos y para finalizar se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 1 minuto. Este último paso se hizo dentro de la cámara de flujo laminar. Todas las inmersiones en los desinfectantes se hicieron seguidas por varios lavados con agua destilada estéril para eliminar cualquier tipo de residuo.

6.3.5. Siembra e incubación de los cultivos

Los explantes de yemas apicales y laterales fueron disectados en una caja de petri con ayuda de pinzas de disección, flameadas en forma sucesiva inmediatamente los explantes fueron inoculados en el medio de cultivo, al finalizar la siembra, los frascos de vidrio fueron tapados y sellados con cintas de papel parafilm e identificados. Este procedimiento se hizo también dentro de la cámara de flujo laminar.

Luego de identificar y marcar los frascos de vidrio estos fueron colocados dentro del cuarto de crecimiento del laboratorio de cultivos vegetales, a 25 grados centígrados de temperatura a próximamente

y un fotoperíodo de 16 horas . En estas condiciones estuvieron los explantes durante un tiempo de 10 - 15 días.

6.4. Fases del desarrollo de la investigación

6.4.1. Fase de multiplicación de brotes

De los brotes obtenidos en la fase de establecimiento inicial se tomaron ápices de 6 a 8 mm. de longitud. Esta fase consistió en subcultivar los explantes de nuevo a diferentes medios de cultivo, con adición de los reguladores del crecimiento auxinas y citocininas en diferentes concentraciones. El medio MS (Murashige y Skoog) suplementado con sacarosa 30% y solidificado con agar 8%. Los reguladores del crecimiento que se utilizaron fueron: ácido naftalenacético (ANA) y la citocinina, (BAP) 6 - bencilaminopurina Para esta fase se utilizaron 9 combinaciones hormonales de ANA y BAP tal como se describe en el (Cuadro 8)

Los frascos conteniendo el medio y los explantes fueron identificados, colocando una etiqueta también en la parte inferior de los mismos, lo que indicó el tipo de cultivar explante y concentración, fecha de subcultivo y el código para el tratamiento respectivo, seguidamente los frascos fueron colocados en los estantes del cuarto de crecimiento del laboratorio de cultivos vegetales, a 25 grados centígrados de temperatura y un fotoperíodo de 16 horas. En estas condiciones estuvieron los explantes durante un periodo de 60 días, para dar lugar a la multiplicación de brotes.

6.4.2. Unidad experimental

Para la multiplicación de brotes se utilizaron frascos de 100 ml de capacidad y a cada recipiente se le agregó 20 ml del medio de cultivo.

Cuadro 1. Número de tratamiento Para la fase de multiplicación de brotes

TIPOS DE EXPLANTE	CULTIVARES	CONCENTRACION DE AUXINAS-CITOCININAS	
		ANA mg/l	BAP mg/l
APICAL	Samantha	0.1	0.5
		0.2	0.5
		0.3	0.5
		0.1	1.5
		0.2	1.5
		0.3	1.5
		0.1	2.5
		0.2	2.5
		0.3	2.5

Continuación Cuadro I.			
		0.2	0.5
		0.3	0.5
		0.1	1.5
		0.2	1.5
		0.3	1.5
		0.1	2.5
		0.2	2.5
		0.3	2.5
	Peach	0.1	0.5
	Peach	0.2	0.5
	Peach	0.3	0.5
	Peach	0.1	1.5
	Peach	0.2	1.5
	Peach	0.3	1.5
	Peach	0.1	2.5
	Peach	0.2	2.5
	Peach	0.3	2.5
LATERAL	Samantha	0.1	0.5
	Samantha	0.2	0.5
	Samantha	0.3	0.5
	Samantha	0.1	1.5
	Samantha	0.2	1.5
	Samantha	0.3	1.5
	Samantha	0.1	2.5
	Samantha	0.2	2.5
	Samantha	0.3	2.5
	Samantha	0.1	0.5
	Cristaline	0.2	0.5
	Cristaline	0.3	0.5
	Cristaline	0.1	1.5
	Cristaline	0.2	1.5
	Cristaline	0.3	1.5
	Cristaline	0.1	2.5
	Cristaline	0.2	2.5
	Cristaline	0.3	2.5
	Peach	0.1	0.5
	Peach	0.2	0.5
	Peach	0.3	0.5
	Peach	0.1	1.5
	Peach	0.2	1.5
	Peach	0.3	1.5
	Peach	0.1	2.5
	Peach	0.2	2.5
	Peach	0.3	2.5

6.4.3. Factores que se evaluaron en la fase de multiplicación de brotes

3 cultivares de rosal Samantha, Cristaline y Peach

9 diferentes combinaciones de Auxinas mas Citocininas

2 tipos de explante.

Se utilizaron nueve combinaciones hormonales distribuidos entre los rangos de 0.1 a 0.3 mg/l de ANA y 0.5 a 2.5 mg/l de BAP. Mediante pruebas preliminares se estableció que en estos rangos se podrían obtener las respuestas esperadas; es decir multiplicación de brotes a partir de yemas apicales y laterales inoculados en el medio nutritivo.

6.4.4. Variables respuestas en la fase de multiplicación de brotes

Número de brotes inducidos

Número de hojas por brote.

6.4.5. Toma de datos

Para la variable número de brotes inducidos se fueron haciendo observaciones cada 15 días después de la siembra, se contó el número de brotes inducidos en la base del explante (Cuadro 14A).

Para la variable número de hojas por brote se fueron haciendo observaciones cada 15 días después de la siembra, se contó el número de hojas inducidas desde la base del tallo a la parte apical del explante (Cuadro 20) tabla de toma de datos.

6.4.6. Diseño Experimental

Debido a las condiciones homogéneas de manejo y ambiente dentro del laboratorio de cultivos vegetales, se empleó un diseño experimental completamente al azar, con arreglo trifactorial.

6.4.7. Modelo Estadístico

TRIFACTORIAL.

A = Cultivar $i = 1$ hasta 3

B = Explante $j = 1$ hasta 2

C = Combinaciones de Auxinas y citocininas $k = 1$ hasta 9.

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + C_k + AB_{ij} + AC_{ik} + BC_{jk} + ABC_{ijk} + E_{ijk}.$$

En donde :

Y_{ijk} = Variable de respuesta de la ijk –ésimo frasco de vidrio

μ = Efecto de la media general

A_i = Efecto del i -ésimo nivel del explante

B_j = Efecto del j -ésimo nivel del cultivar

C_k = Efecto del k -ésimo nivel de las concentraciones

A_{bij} = Efecto de la interacción entre el i -ésimo nivel del cultivar y el j -ésimo nivel del explante.

AC_{ik} = Efecto de la interacción entre el i -ésimo nivel del cultivar y el k -ésimo nivel de las concentraciones.

BC_{jk} = Efecto de la interacción entre el j -ésimo nivel del explante y el k -ésimo nivel de las concentraciones.

ABC_{ijk} = Efecto de la interacción entre el i -ésimo nivel del cultivar, j -ésimo nivel del explante y k -ésimo nivel de las concentraciones.

E_{ijk} = Error experimental asociado a la ijk -ésimo frasco de vidrio.

6.4.8. Análisis de la Información

Para el proceso de la información se utilizó el sistema de análisis estadístico SAS. Se intentó normalizar las variables por medio de $\sqrt{x+1}$, \log_{10} de $x+1$, ShapiroWilks. Sin lograr normalizar la distribución de los datos, para lo cual las observaciones se agruparon por rangos y estos fueron los que se utilizaron en el análisis de varianza. Para el caso de la fuente 0.1 de variación (ejemplo cultivar por explante por concentración) que fueron los que presentaron alta significancia. Derivado de lo anterior se procedió a utilizar estadística no paramétrica utilizando para el efecto la técnica de Kruskal Wallis, y se realizó separación de medias por el método Tukey al 5 % de significancia.

6.4.9. Fase de enraizamiento de brotes

Esta etapa consistió en seleccionar los brotes de 1 a 2 cm. de longitud provenientes de la fase anterior y posteriormente fueron transferidos a un medio de MSM (Murashige y Skoog Modificado) con la concentración de sales reducidas en un 50% más sucrosa al 1% en presencia del ácido indolacético (AIA).

Las concentraciones que se utilizaron del AIA se muestran en el (Cuadro 9). Esta fase al igual que la anterior se realizó en la cámara de flujo laminar. Se identificaron los cultivos precisando fecha y tipo de cultivar. Posteriormente se colocaron los cultivos en los estantes de crecimiento con las condiciones ambientales ya mencionadas, durante un período de 40 días.

6.4.10. Factores Evaluados en la fase de Enraizamiento de Brotes

- 3 Cultivares de rosal samantha, cristaline y peach
- 3 Concentraciones de auxinas
- 2 Tipos de Explante.

Cuadro 2. Número de tratamientos para la fase de enraizamiento de brotes en *Rosa sp.*

TIPOS DE EXPLANTE	CULTIVARES	CONCENTRACION DE AUXINAS AIA mg/l
APICAL	Samantha	0.1
		0.3
		0.5
	Cristaline	0.1
		0.3
		0.5
	Peach	0.1
		0.3
		0.5
LATERAL	Samantha	0.1
		0.3
		0.5
	Cristaline	0.1
		0.3
		0.5
	Peach	0.1
		0.3
		0.5

6.4.11. Variables de respuestas en la fase de enraizamiento

Número de raíces por brote

Longitud de raíces por brote.

6.4.12. Toma de datos

Para la variable número de raíces por brote cultivado se fueron haciendo observaciones cada 10 días después de la siembra, se contó el número de raíces inducidas desde la base del tallo hacia la parte apical de la planta (Cuadro 21).

Para la variable longitud de raíces por brote se fueron haciendo observaciones cada 10 días después de la siembra, se registró la longitud de raíces, desde la base radicular hasta la parte final de la raíz (Cuadro 21).

6.4.13. Diseño experimental.

Se hizo de manera similar a la fase anterior empleándose un diseño experimental completamente al azar, con arreglo trifactorial .

6.4.14. Análisis de la información

Para el proceso de la información se utilizó el sistema de análisis estadístico SAS. Se intentó normalizar las variables por medio de $\sqrt{x+1}$, $\log_{10} x+1$, Shapiro Wilks. Sin lograr normalizar la distribución de los datos, para lo cual las observaciones se agruparon por rangos y estos fueron los que se utilizaron en el análisis de varianza. Para el caso de la fuente de variación ejemplo cultivar por explante por concentración que fueron los que presentaron alta significancia. Derivado de lo anterior se procedió a utilizar estadística no paramétrica utilizando para el efecto la técnica de Kruskal y Wallis; se realizó separación de medias por el método de Tukey al 5 %, de significancia.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1. Observaciones en el montaje del experimento

Durante la desinfección de explantes se observó que los tratamientos con unas gotas de hipoclorito de sodio, agua estéril y jabón líquido durante 20 minutos y con alcohol al 70 % durante 3 minutos más hipoclorito de sodio al 10% durante 15 minutos, son efectivos para una adecuada esterilización del explante y un bajo nivel de daño al tejido.

7.2. Fase de multiplicación de brotes

7.2.1. Numero de brotes inducidos por explante cultivado

En esta etapa hubo diferencia estadística significativa entre los factores explante por concentración; del resumen del análisis de varianza para la variable número de brotes inducidos en nueve diferentes concentraciones de auxinas – citocininas con dos tipos de explante en *Rosa sp.* variedades Samantha, Cristaline y Peach (Cuadro 10). Se efectuó una prueba múltiple de comparación de medias (Cuadro 11) con la finalidad de determinar el comportamiento de los factores. La prueba utilizada fue Tukey con un nivel de significancia de 0.05. En el cuadro 3 se observa el número de brotes promedio con las combinaciones hormonales de auxinas – citocininas con yemas apical y lateral en rosa *in vitro*.

En todos los tratamientos inclinados en la fase de inducción y multiplicación de brotes se observó respuesta, utilizando las diferentes combinaciones hormonales que se presentaron en el estudio, esto nos indica que combinando dosis de ácido naftalenacético (ANA) entre 0.1 y 0.3 mg/l con dosis de bencilaminopurina (BAP) con un rango entre 0.5 y 2.5 mg/l pueden promover la inducción y multiplicación de brotes en el cultivo de rosal en las variedades Samantha, Cristaline y Peach. También se pudo observar que el tipo de explante utilizado para la inducción de brotes no es determinante, es decir que las yemas apicales o laterales pueden ser útiles para propagar las variedades de rosa en estudio.

En el cuadro 3 se puede observar que el número de brotes obtenidos por explante varió entre 0.44 y 2.00. Con ello puede notarse la eficiencia de inducción de brotes al utilizar los tratamientos descritos, puede observarse que el mayor número de brotes por explante se obtuvo cuando se cultivo yema apical, agregando al medio de cultivo 0.2 mg/l de ANA mas 2.5 mg/l de BAP con cualquiera de las tres

variedades. Al hacer una comparación de medios del número de brotes por explante se pudo establecer que en todos los casos los brotes fueron muy suculentos y traslúcidos de color verde con una buena elongación (observación no cuantificada).

Cuadro 3: Respuesta del número promedio de brotes inducidos con los dos tipos de explante de rosal a la aplicación de auxinas más citocininas en tres variedades Samantha, Cristaline y Peach.

TIPO DE EXPLANTE	COMBINACION HORMONAL		NUMERO PROMEDIO DE BROTES INDUCIDOS
	BAP Mg/l	ANA mg/l	
Apical	0.2	2.5	2.00
Apical	0.3	2.5	1.66
Lateral	0.3	0.5	1.55
Lateral	0.1	0.5	1.55
Apical	0.3	1.5	1.44
Lateral	0.3	2.5	1.44
Lateral	0.2	0.5	1.44
Apical	0.2	0.5	1.33
Lateral	0.2	1.5	1.33
Apical	0.3	0.5	1.22
Apical	0.2	1.5	1.22
Lateral	0.1	2.5	1.11
Apical	0.1	0.5	1.11
Lateral	0.1	1.5	1.11
Apical	0.1	2.5	1.00
Lateral	0.3	1.5	0.88
Apical	0.1	1.5	0.88
Lateral	0.2	2.5	0.44

Los brotes se desarrollaron entre 3 y 4 semanas de realizada la siembra.

Burgarín Mr. Lozoya H. (6) En la propagación *in vitro* del portainjerto Rosa x noisettiana cv. Manetti a partir de yema axilares reporta la obtención de 3 a 7 brotes axilares por yema por sub cultivo cada 4 a 6 semanas, también indica que al eliminar la yema terminal de los brotes obtenidos *in vitro* durante el primer subcultivo, en el siguiente se favorece la brotación lateral. Consecuentemente, el ápice ejerce una influencia sobre las yemas laterales mismas que se nulifican al eliminar la punta de la plántula.

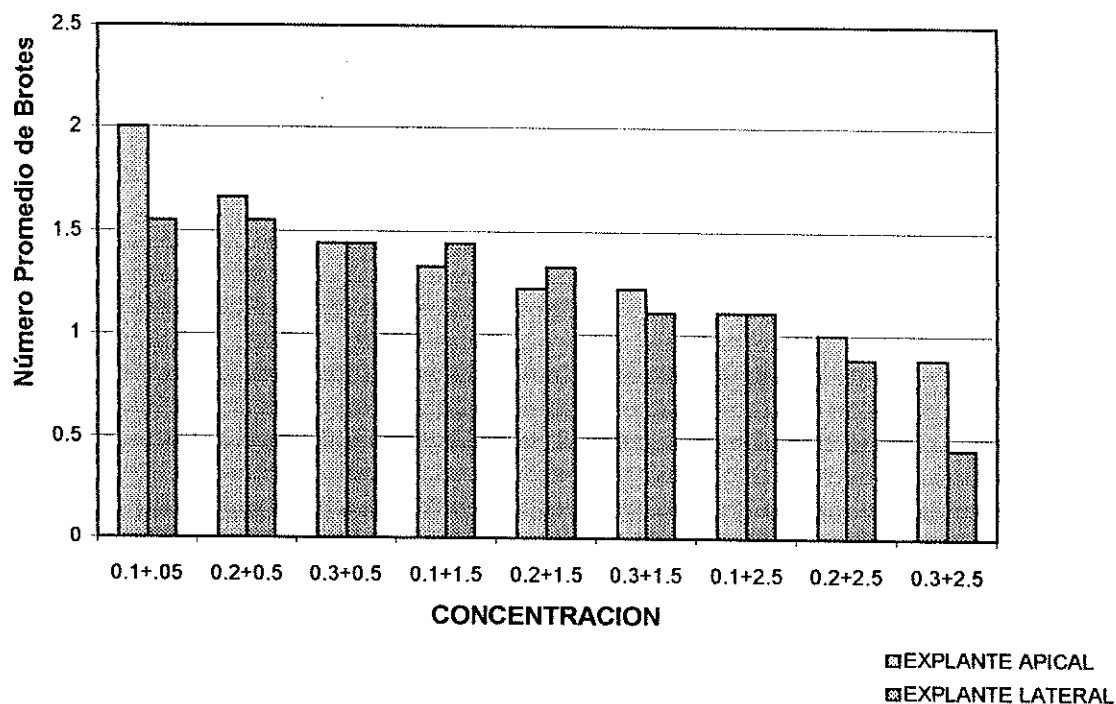


Figura 1. Número de brotes inducidos en la fase de multiplicación en comparación de dos tipos de explantes en función de las concentraciones.

7.2.2. Número de hojas por brote cultivado

Debido a la alta significancia entre los factores cultivar por explante del resumen del análisis de varianza para la variable número de hojas por brote en nueve diferentes concentraciones de auxinas – citocininas con dos tipos de explante en *Rosa sp.* variedades Samantha, Cristaline y Peach, (Cuadro 12); se efectuó una prueba múltiple de comparación de medias (Cuadro 13); con la finalidad de determinar el comportamiento de los factores. La prueba utilizada fue Tukey con un nivel de significancia de 0.05. En el cuadro 4 se observa el número promedio de hojas por brote cultivado en los tres cultivares con las combinaciones hormonales de auxinas – citocininas con yema apical, yema lateral en rosa *in vitro*.

En todos los tratamientos inclinados en la fase de inducción de hojas se observó respuesta, utilizando las diferentes combinaciones hormonales que se presentaron en el estudio, esto nos indica que combinando dosis de ácido naftalenacético (ANA) entre 0.1 y 0.3 mg/l con dosis de bencilaminopurina

(BAP) con un rango entre 0.5 y 2.5 mg/l pueden promover la inducción de hojas en el cultivo de rosal en las variedades Samantha, Cristaline y Peach. También se pudo observar que el tipo de explante utilizado para la inducción de hojas no es determinante, es decir que las yemas apicales o laterales pueden ser útiles para propagar las variedades de rosal en estudio.

En el cuadro 4 se puede observar que el número de hojas obtenidas por explante y cultivar varió entre 4.81 y 11.88. Con ello puede notarse la eficiencia de inducción de hojas al utilizar los tratamientos descritos, puede observarse que el mayor número de hojas por explante y cultivar se obtuvo cuando se cultivo yema apical con el cultivar Peach agregando al medio de cultivo cualquiera de las combinaciones hormonales mencionadas. Al hacer una comparación de medias del número de hojas por explante y cultivar se pudo establecer que este tratamiento se separó significativamente del resto. Sin embargo pudo observarse que en todos los casos las hojas fueron muy suculentos y traslúcidos de color verde con una buena parte foliar (observación no cuantificada).

Cuadro 4: Respuesta del número de hojas promedio, con los dos tipos de explante y los tres cultivares del rosal a la aplicación de auxinas y citocininas *in vitro*.

CULTIVAR	TIPO DE EXPLANTE	NUMERO PROMEDIO DE HOJAS INDUCIDAS
Peach	Apical	11.88
Cristaline	Lateral	7.92
Samantha	Lateral	7.22
Samantha	Apical	5.66
Peach	Lateral	5.40
Cristaline	Apical	4.81

Las hojas se desarrollaron entre 4 y 5 semanas de realizada la siembra.

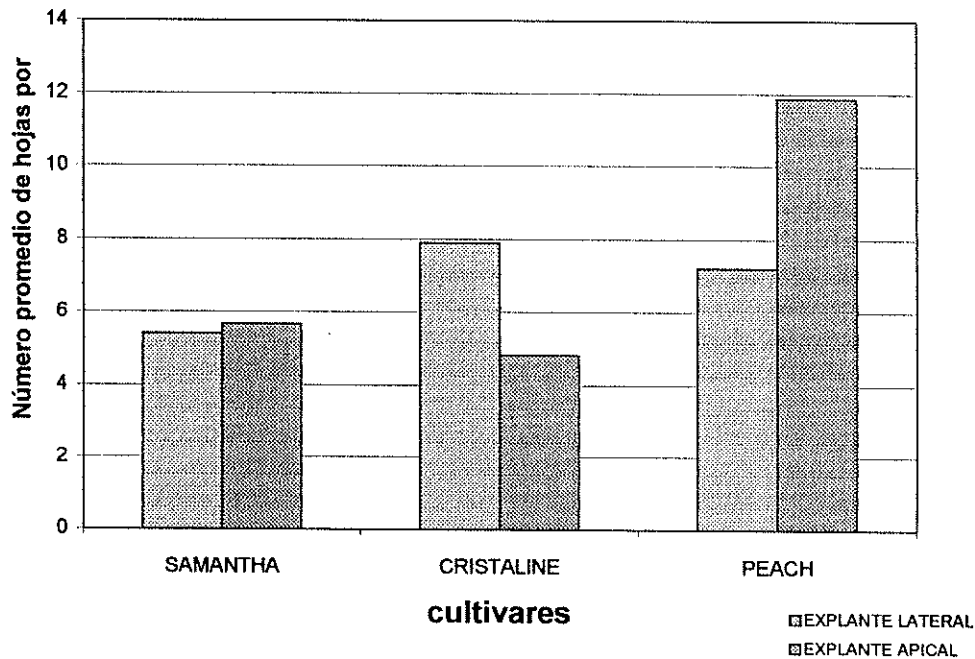


Figura. 2. Numero promedio de hojas por brote en la fase de multiplicación en comparación de dos tipos de explante en función de los cultivares

7.3. Fase de enraizamiento de brotes

7.3.1 Número de raíces por brote.

Los resultados del resumen de análisis de varianza del (Cuadro 14) coinciden con los trabajos realizados por Burgarin Mr. Lozoya H. (6) quien evaluó propagación *in vitro* del Portainjerto, *Rosa X noisettiana* CV. "Manettii" a partir de yemas axilares. Dicho autor encontró en los ensayos de auxinas; el enraizamiento de brotes, se evidenció entre los 14 y 28 días después de la siembra, indujo el ácido indolacético AIA. Con sales reducidas en 50 % y logró un 100% de enraizamiento al incorporar 0.1 mg/l de AIA.

En cuanto a lo observado en esta fase, el enraizamiento de brotes se evidencio entre la tercera y cuarta semana después de la siembra, los máximos porcentajes aparecieron a los 25 días de incubación y después de ese tiempo disminuyó la frecuencia de aparición de raíces, con la incorporación del ácido indolacético AIA en concentraciones de 0.1, 0.3, 0.5 mg/l. Pues las plantas mantenidas en ese medio mostraron raíces en el 90% de su población.

Debido a la alta significancia entre los factores cultivar por explante por concentración del resumen del análisis de varianza para la variable número de raíces por brote en tres diferentes concentraciones de auxinas con dos tipos de explante en *Rosa sp.* Variedades Samantha, Cristaline y Peach, (Cuadro 14); se efectuó una prueba múltiple de comparación de medias (Cuadro 15); con la finalidad de determinar el comportamiento de los factores. La prueba utilizada fue Tukey con un nivel de significancia de 0.05. En el cuadro 3 se observa el número promedio de raíces por brote en los tres cultivares con las concentraciones hormonales de auxinas con yema apical y lateral en rosa *in vitro*.

En todos los tratamientos inclinados en la fase de enraizamiento se observó respuesta, utilizando las diferentes concentraciones hormonales que se presentaron en el estudio, esto nos indica que agregando dosis de ácido indolacético (AIA) entre 0.1, 0.3 y 0.5 mg/l al medio de cultivo con sus sales reducidas en un 50% del medio MS pueden promover la inducción de raíces en el cultivo de rosal en las variedades Samantha, Cristaline y Peach. También se pudo observar que el tipo de explante utilizado para la inducción de raíces no es determinante, es decir que las yemas apicales o laterales pueden ser útiles para enraizamiento de las variedades de rosal en estudio.

En el cuadro 5 se puede observar que el número de raíces obtenidas por cultivar por explante por concentración varió entre 0.00 y 2.40. Con ello puede notarse la eficiencia de inducción de raíces al utilizar los tratamientos descritos, puede observarse que el mayor número de raíces por cultivar por explante y concentración se obtuvo cuando se cultivo yema lateral con el cultivar 2 Cristaline agregando al medio de cultivo 0.1 mg/l de ácido indolacético AIA. Al hacer una comparación de medias del número de raíces por cultivar por explante y concentración se pudo establecer que este tratamiento se separó significativamente del resto.

Cuadro 5: Respuesta del número promedio de raíces, con los dos tipos de explante de rosa a la aplicación de auxinas en el medio MS con sus sales reducidas en un 50 % en tres variedades Samantha, Cristaline y Peach.

CULTIVAR	TIPO DE EXPLANTE	CONCENTRACION DE AIA en mg/l	NUMERO PROMEDIO DE RAICES POR BROTE
Cristaline	Lateral	0.1	2.40
Cristaline	Apical	0.3	2.40
Samantha	Lateral	0.1	2.40
Cristaline	Apical	0.1	2.40
Peach	Apical	0.1	1.80
Peach	Apical	0.3	1.60
Peach	Lateral	0.5	1.60
Samantha	Apical	0.5	1.40
Peach	Lateral	0.3	1.20
Cristaline	Lateral	0.3	1.20
Peach	Lateral	0.1	1.20
Samantha	Lateral	0.3	1.20
Samantha	Apical	0.3	1.00
Peach	Apical	0.5	0.20
Samantha	Apical	0.1	0.20
Cristaline	Apical	0.5	0.00
Cristaline	Lateral	0.5	0.00
Samantha	Lateral	0.5	0.00

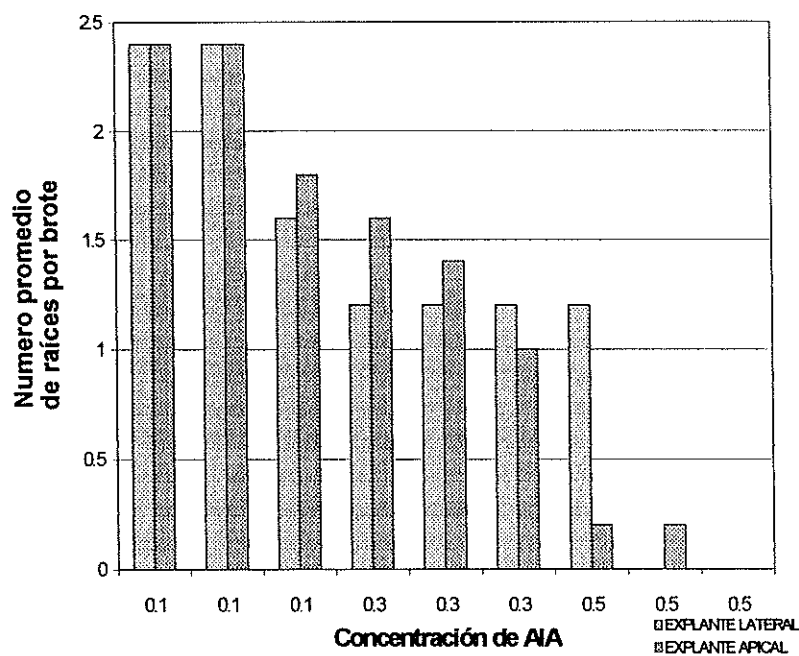


Figura 3. Numero promedio de raíces por brote en la fase de enraizamiento en comparación de los dos tipos de explante lateral y apical en función de las concentraciones de ácido indolacético.

7.3.2 Longitud de raíces por brote adventicio

Debido a la alta significancia entre los factores cultivar por explante por concentración del resumen del análisis de varianza para la variable longitud de raíces por brote adventicio de tres diferentes concentraciones de auxinas con dos tipos de explante en *Rosa* sp. Variedades Samantha, Cristaline y Peach, (Cuadro 16); se efectuó una prueba múltiple de comparación de medias (Cuadro 17); con la finalidad de determinar el comportamiento de los factores. La prueba utilizada fue Tukey con un nivel de significancia de 0.05. En cuadro 4 se observa la longitud promedio de raíces por brote adventicio en los tres cultivares con las concentraciones hormonales de auxinas, con yema apical y lateral en rosa in vitro.

En todos los tratamientos inclinados en la fase de enraizamiento se observó respuesta, utilizando las diferentes concentraciones hormonales que se presentaron en el estudio, esto nos indica que agregando dosis de ácido indolacético (AIA) entre 0.1, 0.3 y 0.5 mg/l al medio de cultivo con sus sales reducidas en un 50% del medio MS pueden promover la inducción adventicia de raíces en el cultivo de rosal en las variedades Samantha, Cristaline y Peach. También se pudo observar que el tipo de explante utilizado para la inducción adventicia de raíces no es determinante, es decir que las yemas apicales o laterales pueden ser útiles para enraizamiento de las variedades de rosal en estudio.

En cuadro 6 se puede observar que la longitud (cm) de raíces obtenidas por cultivar por explante por concentración varió entre 0.00 y 4.12. Con ello puede notarse la eficiencia de inducción adventicia de raíces al utilizar los tratamientos descritos, puede observarse que la mayor longitud de raíces por cultivar por explante y concentración se obtuvo cuando se cultivo yema lateral con el cultivar 2 Cristaline agregando al medio de cultivo 0.1 mg/l de ácido indolacético AIA. Al hacer una comparación de medios de la longitud de raíces por cultivar por explante y concentración se pudo establecer que este tratamiento se separó significativamente del resto.

La longitud de raíces se empezó a evidenciar a las 3 y 4 semanas después de la siembra; en cuanto a lo observado en esta fase como se menciona, los máximos porcentajes aparecieron a los 25 y 30 días, en este período los brotes fueron con hojas muy suculentas y traslúcidos verde con una buena elongación de raíces y después de ese período disminuyó la frecuencia de aparición de raíces, induciendo callosidad en

de verde a un color amarillento, también se pudo observar que cambiando o renovando a las 5 semanas el medio con las mismas características mencionadas esto no sucede (observación no cuantificada).

Cuadro 6: Longitud promedio de raíces, mediante la aplicación de auxinas en el medio MS con sus sales reducidas en un 50 % en tres variedades Samantha, Cristaline y Peach en Rosa sp.

CULTIVAR	TIPO DE EXPLANTE	CONCENTRACION DE AIA en mg/l	LONGITUD PROMEDIO DE RAICES en (cm)
Cristaline	Lateral	0.1	4.12
Cristaline	Apical	0.3	1.56
Samantha	Lateral	0.1	1.24
Cristaline	Apical	0.1	1.22
Samantha	Apical	0.5	1.14
Peach	Apical	0.3	1.00
Peach	Lateral	0.5	1.00
Peach	Apical	0.1	0.86
Cristaline	Lateral	0.3	0.84
Peach	Lateral	0.3	0.80
Samantha	Apical	0.3	0.76
Cristaline	Lateral	0.1	0.68
Samantha	Lateral	0.3	0.42
Cristaline	Apical	0.5	0.10
Samantha	Apical	0.1	0.10
Cristaline	Apical	0.5	0.00
Cristaline	Lateral	0.5	0.00
□Samantha	Lateral	0.5	0.00

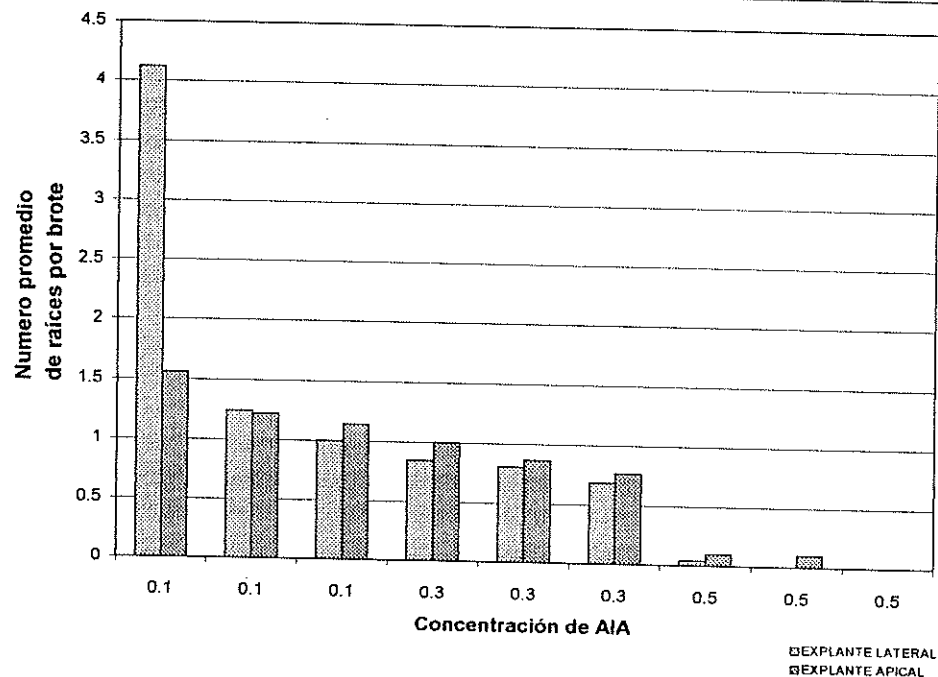


Figura 4. Longitud de raíces por brote en la fase de enraizamiento en comparación de los dos tipos de explante en función de las concentraciones de Auxinas.

8. CONCLUSIONES.

Después de analizar e interpretar los resultados obtenidos se pueden resaltar las siguientes conclusiones:

1. Los tres (cultivares Samantha, Cristaline y Peach) sometidos a micropropagación mostraron respuesta a la fase de multiplicación.
2. Los tres cultivares presentaron brotes en la fase de multiplicación.
3. Los cultivares Cristaline y Peach presentaron mayor número de hojas y brotes.
4. Los dos explantes en estudio presentaron entre 2 a 3 brotes por explante.
5. La combinación de reguladores del crecimiento más adecuada para la multiplicación de brotes en los tres cultivares fue: Acido naftalenacético en dosis de 0.2 mg/l mas Bencilaminopurina 2.5 mg/l.
6. En la fase de enraizamiento, los tres cultivares presentaron raíces, utilizando ácido indolacético en concentraciones de 0.1 mg/l, 0.3 y 0.5 en el medio de Murashige – Skoog diluido al 50% de su concentración original.
7. En la fase de enraizamiento los dos explantes en estudio presentaron de 2 a 4 raíces por brote adventicio.

9. RECOMENDACIONES.

Para una eficiente multiplicación y enraizamiento in vitro de rosal, variedades Samantha, Cristaline y Peach, se hacen las siguientes recomendaciones.

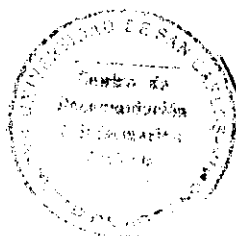
1. Como fuente el inóculo de preferencia utilizar yemas apicales, aunque estadísticamente no hay diferencias entre utilizar yemas apicales y laterales.
2. En la fase de inducción y multiplicación de brotes agregar al medio de cultivo MS, alrededor de la siguiente combinación hormonal 0.2 mg/l de ácido naftalenacético mas 2.5 mg/l de bencilaminopurina.
3. Los brotes adventicios obtenidos en la fase de inducción pueden ser enraizados en el medio de cultivo MS diluido al 50 % de su concentración. Al medio debe ser agregado ácido indolacético a razón de 0.1, 0.3 ó 0.5 mg/l indistintamente.

10. BIBLIOGRAFIA.

1. ARANA GONZALEZ, A.D. 1994. Cultivo de rosas en Agrícola Norcafé, Parramos, Chimaltenango. Informe final P. Agr. Guatemala, Escuela Nacional Central de Agricultura. 61 p.
2. AREVALO M., A.D. 1993. Evaluación de la respuesta a la inducción de callo y regeneración de plantas de gipsofilia (*Gypsophilia paniculata*) variedad, Bristol Fine) utilizando varios explantes y tratamientos de auxinas y citocininas en condiciones diferentes de luz. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 75 p.
3. BATRES F., B.V. 1995. Evaluación de diferentes medios de cultivos y explantes para la inducción de organogenesis indirecta en la especie ornamental *Anthurium andreanum* lind. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad Rafael Landívar, Facultad de Ciencias Agrícolas y Ambientales. 55 p.
4. BENITES, C.J. 1977. Curso de floricultura. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 173 p.
5. BERRIOR, A.; BERTHOULY, M. 1987. Tecnología del cultivo de tejidos de café, medios y métodos de cultivo *in vitro*. Manual 2.11. s.n.t. 37 p.
6. BURGARIN, M. R.; LOZOYA, H. (1992). Propagación *in vitro* del portainjerto *Rosa noisettiana*; a partir de yemas axilares. Revista Chapingo (Méx.) no. 78: 59-43.
7. CRONQUIST, A. 1981. An integrated, system of flowering plants. New York, EE.UU., The New York Botanical Garden. 576 p.
8. DODOS, H.; ROBERTS, L. 1986. Experiments in plant tissue culture. 2 ed. EE.UU., Conbridge University Press. 232 p.
9. FERRER F; SALVADOR, P. 1986. La producción de rosas en cultivo protegido. Sevilla, España, Universal Plantas. P. 9 – 14
10. HARTMANN, H.T. 1984. Propiedades de plantas, principios y prácticas. México, CECSA. p. 639-666.

11. HARTMAN, K. 1989. Propagación de plantas. Trad. Antonio Marino. Mexico, Continental. 760 p.
12. HURTADO, D.V.; MERINO, M.E. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. 231 p.
13. LITZ, R.E.; JARRET, R.L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos; embriogénesis somática y organogénesis. In cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Edición William Roca; Luis A. Mroginski, Colombia; CIAT. p. 143 – 172.
14. MROGINSKI, L. A.; ROCA, W.M. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos, aplicaciones. Ed. William Roca; Luis A. Colombia, CIAT p. 19 – 40.
15. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* (EE.UU) 15:473- 497.
16. PEREA, D.; NAVARRO, A.W. 1988. Técnicas *in vitro* para la producción mejoramiento de plantas. Costa Rica, Universidad Nacional de Heredia. 105 p.
17. RANDOLP, H. et al 1985. Tissue culture in forestry and agriculture. EE.UU., Plenum Press. 379 p.
18. ROCA, C.E. 1996. Respuesta de dos diferentes tipos de zapote (*Pouteria sapota* L. Cronquist) la organogénesis directa utilizando dos medios basales de cultivo y tres tipos de reguladores del crecimiento, en diferentes concentraciones. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 90 p.
19. ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura fundamentos y aplicaciones. Colombia, CIAT. 970 p.
20. SIMMONS, C.S.; TARANO, J.M.; PINTO, J.H. 1959. Clasificación de reconocimiento de los suelos de la República de Guatemala. Trad.por Pedro Tirado Sulsona. Guatemala, Ed. José de Pineda Ibarra. 1000 p.
21. THORPE, T.A. 1987. Plant tissue culture and applications in agriculture. New York, EE.UU., Academic Press. 177 p.

22. TODO SOBRE Rosa. s. f. Ed. Ken Burke EE.UU., Sociedad Americana. P. 70 - 160
23. TORRES MONTOYA, E.R. 1993. Enraizamiento *in vitro* del rosal *Rosa hibrida L.* cultivar Royalty. Revista Chapingo (Mex.) no. 78:80 - 85.
24. VASQUEZ, F.; CARRILLO, E.; MEJIA, L. 1,991. Biotecnología. Guatemala, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. 22 p.
25. VILLALOBOS, W.M.; THORPE, T.A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. en Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Ed. William Roca; Luis A. Mroginski. Colombia, CIAT p. 127 - 141.
25. WEAVER, R.J. 1987. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. México, Trillas. 622 p.
27. WHITE, P.R. 1934. Potentially unlimited of excised tomato root in a liquid medium. Plant Physiology (EE.UU) 8(4): 560 - 585.
28. YURRITA ELGUETA, R. 1987. Cultivo comercial de flores. Guatemala, Universidad Rafael Landívar. 125 p.



No. Bo. Rolando Barrios.

11. APENDICE

Cuadro 7. Composición del medio basal de Murashige- Skoog 1962 para el cultivo *in vitro* de tejidos.

COMPONENTES	CONTENIDOS DEL MEDIO MS (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650.00
KNO ₃	1900.00
KH ₂ PO ₄	170.00
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440.00
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.20
MnSO ₄ . 7H ₂ O	22.30
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.60
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.25
CuSO ₂ . 5H ₂ O	0.025
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27.80
Na ₂ EDTA	37.30
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025
Glicina	2.00
Tiamina - HCl	0.10
Piridoxina - HCl	0.50
Acido Nictinico	0.50
Myo-inositol	100.00
Sacarosa	30,000.00
PH	5.7

Cuadro 8. Concentraciones de Auxinas – Citocininas utilizadas en el medio MS Murashige – Skoog 1962 en la multiplicación de brotes a partir de dos tipos de explante, yema apical y lateral en *Rosa sp.* Variedad Samantha, Cristaline y Peach.

CONCENTRACIONES DE :	
AUXINAS mg/l	CITOCININASmg/l
0.1	0.5
0.2	0.5
0.3	0.5
0.1	1.5
0.2	1.5
0.3	1.5
0.1	2.5
0.2	2.5
0.3	2.5

Cuadro 9. Concentraciones de Auxinas utilizadas en el medio MSM= Murashige – Skoog modificado con concentraciones de sales reducidas en un 50% para la fase de enraizamiento a partir de brotes inducidos de *Rosa sp.* Variedad Samantha, Cristaline y Peach en tres concentraciones de (AIA) ácido indolacético.

Medio basal	Concentraciones de Auxinas mg/l para enraizamiento de plantas	
	Murashige y Skoog	AIA
Modificado a 50% de sus sales reducida.	0.1	mg/l
	0.3	mg/l
	0.5	mg/l

Cuadro 10. Resumen del Análisis de varianza para la variable número de brotes regeneradas en nueve diferentes concentraciones de auxinas – citocininas con dos tipos de explante en *Rosa sp.* variedades Samantha, Cristaline y Peach.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	Pr>F
Cultivar	2	6793.44	3396.72	0.1293
Explante	1	1561.78	1561.78	0.3297
Cultivar Por Explante	2	5968.60	2984.30	0.1651
Concentración	8	12927.22	1615.90	0.4467
Cultivar por Concentración	16	16277.66	1017.35	0.8581
Explante por Concentración	8	36111.27	4513.90	0.0080
Cultivar por Explante por Con.	16	28715.83	1794.73	0.3629
Error	108	155970.66	1629.35	
TOTAL	161	284326.50		

C.V. = 49.53.

Cuadro 11. Prueba de medias (Tukey) para la interacción explante por concentración de la variable número de brotes inducidos en nueve diferentes concentraciones de auxinas – citocininas con dos tipos de explante en *Rosa sp.* variedades Samantha, Cristaline y Peach.

EXPLANTE	COMBINACION HORMONAL		MEDIA DE NUMERO DE BROTOS INDUCIDOS
	BAP mg/l	ANA mg/l	
Apical	0.2	2.5	117
Apical	0.3	2.5	105.88
Lateral	0.3	0.5	103.33
Lateral	0.1	0.5	94.66
Apical	0.3	1.5	90
Lateral	0.3	2.5	88.44
Lateral	0.2	0.5	86.88
Apical	0.2	0.5	85.66
Lateral	0.2	1.5	82.77
Apical	0.3	0.5	79.22
Apical	0.2	1.5	76.88
Lateral	0.1	2.5	76.66
Apical	0.1	0.5	76.66
Lateral	0.1	1.5	71.22
Apical	0.1	2.5	66.33
Lateral	0.3	1.5	63.77
Apical	0.1	1.5	63.77
Lateral	0.2	2.5	37.77

Cuadro 12. Resumen del Análisis de varianza para la variable número de hojas por brote en nueve diferentes concentraciones de auxinas – citocininas con dos tipos de explante en *Rosa sp.* variedades Samantha, Cristaline y Peach.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	Pr>F
Cultivar	2	10526.84	5263.42	0.050
Explante	1	186.88	186.88	0.7456
Cultivar por Explante	2	16597.75	8298.87	0.0111*
Concentración	8	7371.97	921.49	0.8380
Cultivar por Concentración	16	43398.85	2712.42	0.1004
Explante por Concentración	8	41783.80	5222.97	0.0050*
Cultivar por Explante por Con.	16	34844.72	2177.79	0.2555
Error	108	190804.66	1766.70	
TOTAL	161	345515.50		

C. V. = 51.57.

Cuadro 13 Prueba de medias para la interacción cultivar por explante de la variable número de hojas por brote en nueve diferentes concentraciones de auxinas – citocininas con dos tipos de explante en *Rosa sp.* variedades Samantha, Cristaline y Peach.

CULTIVAR	EXPLANTE	MEDIA DE NUMERO DE HOJAS POR BROTE INDUCIDOS
Peach	Apical	106.63
Cristaline	Lateral	83.29
Samantha	Lateral	79.94
Samantha	Apical	78.37
Peach	Lateral	78.03
Cristaline	Apical	62.72

Cuadro 14. Resumen del Análisis de varianza para la variable número de raíces por brote en diferentes concentraciones de auxinas – citocininas con dos tipos de explantes en *Rosa sp* variedades Samantha, Cristaline y Peach.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	Pr>F
Cultivar	2	569.40	84.270	0.5302
Explante	1	10.00	10.00	0.8812
Cultivar por Explante	2	303.80	151.90	0.7118
Concentración	2	9119.85	4559.92	0.0001*
Cultivar por Concentración	4	3803.10	950.77	0.0848
Explante por Concentración	2	1692.95	846.47	0.1565
Cultivar por Explante por Con.	4	6689.50	1672.37	0.0078*
Error	72	32022.90	444.76	
TOTAL	89	54211.50		

C.V. = 46.35

Cuadro 15. Prueba de medias (Tukey) para la interacción cultivar por explante por concentración de la variable número de raíces por brotes en tres diferentes concentraciones de auxinas – citocininas con dos tipos de explante en *Rosa sp.* variedades Samantha, Cristaline y Peach.

CULTIVAR	TIPO DE EXPLANTE	CONCENTRACION DE AIA en mg/l	MEDIA DE NUMERO DE RAICES POR BROTE
Cristaline	Lateral	0.1	68.7
Cristaline	Apical	0.3	67.2
Samantha	Lateral	0.1	66.3
Cristaline	Apical	0.1	61.8
Peach	Apical	0.1	56.1
Peach	Apical	0.3	54.0
Peach	Lateral	0.5	50.4
Samantha	Apical	0.5	48.3
Peach	Lateral	0.3	47.1
Cristaline	Lateral	0.3	47.1
Peach	Lateral	0.1	45.9
Samantha	Lateral	0.3	45
Samantha	Apical	0.3	44.7
Peach	Apical	0.5	26.7
Samantha	Apical	0.1	26.7
Cristaline	Apical	0.5	21
Cristaline	Lateral	0.5	21
Samantha	Lateral	0.5	21

Cuadro 16. Resumen del Análisis de varianza para la variable longitud de raíces por planta en nueve diferentes concentraciones de auxinas con dos tipos de explante en *Rosa sp.* variedades Samantha, Cristaline y Peach.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADO	CUADRADO MEDIO	Pr>F
Cultivar	2	406.46	203.23	0.6469
Explante	1	3.21	3.21	0.9339
Cultivar por Explante	2	189.35	94.67	0.8158
Concentración	2	6916.11	3458.05	0.0011*
Cultivar por Concentración	4	5011.26	1252.81	0.0371*
Explante por Concentración	2	1742.90	871.45	0.1602
Cultivar por Explante por Con.	4	7246.47	1811.61	0.0063*
Error	72	33395.20	463.82	
TOTAL	89	54911.00		

C.V. = 47.33.

Cuadro 17: Prueba de medias (Tukey) para la interacción cultivar por explante por concentración de la variable longitud de raíces por brotes en tres diferentes concentraciones de auxinas con dos tipos de explante en *Rosa sp.* Variedades Samantha, Cristaline y Peach.

CULTIVAR	TIPO DE EXPLANTE	CONCENTRACION DE AIA en mg/l	MEDIA DE LONGITUD DE RAICES POR BROTE
Cristaline	Lateral	0.1	68.5
Cristaline	Apical	0.3	64.9
Samantha	Lateral	0.1	63.8
Cristaline	Apical	0.1	60.5
Samantha	Apical	0.5	56.2
Peach	Apical	0.3	54.8
Peach	Lateral	0.5	52.7
Peach	Apical	0.1	50.6
Cristaline	Lateral	0.3	49.9
Peach	Lateral	0.3	49.7
Samantha	Apical	0.3	46.2
Cristaline	Lateral	0.1	43
Samantha	Lateral	0.3	41.6
Cristaline	Apical	0.5	26.8
Samantha	Apical	0.1	26.8
Cristaline	Apical	0.5	21
Cristaline	Lateral	0.5	21
Samantha	Lateral	0.5	21

Cuadro 18. Pasos que se siguieron en el proceso experimental desde la obtención de los explantes hasta la fase de enraizamiento de *Rosa sp.*

EVENTOS EN EL DESARROLLO DEL ESTUDIO				
FASES	DESINFECCION PREPARACION DEL MATERIAL	SIEMBRA	MULTIPLICACION DE BROTES	ENRAIZAMIENTO
TIEMPO Días	2	8-10	40 - 60	30-40
Desinfección	Alcohol 70% 1-3 min hipoclorito de sodio			
UNIDAD Experimental			Frasco de 100 ml. 1 Explante cada uno 162 ue.	Frasco de 100 ml. 1 explante cada uno 90 ue.
Tratamientos			MS mas ANA mas BAP	½ MS mas AIA

Cuadro 19. ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TRABAJO.

AIA = Acido indolacético

AIB = Acido indolbutírico

ANA = Acido naftalenacético

BA = Bencil adenina

BAP = Bencil amino purina.

GA3 = Acido giberélico

MS. = Medio basal de Murashigue y Skoog

2,4 -D = Acido 2,4 diclorofenoxiacético.

Cuadro 20. Tabla de toma de datos en la fase de multiplicación de brotes.

REPE.	CULTIVAR	EXPLANTE	CONCENTR	NBI	NHB
1	1L		1	2	5
2	1L		1	3	4
3	1L		1	1	15
1	1A		1	1	12
2	1A		1	1	2
3	1A		1	2	4
1	2L		1	1	8
2	2L		1	1	0
3	2L		1	3	25
1	2A		1	1	0
2	2A		1	1	5
3	2A		1	1	3
1	3L		1	1	4
2	3L		1	1	0
3	3L		1	1	0
1	3A		1	1	2
2	3A		1	1	20
3	3A		1	1	18
1	1L		2	1	12
2	1L		2	1	12
3	1L		2	1	12
1	1A		2	1	12
2	1A		2	2	15
3	1A		2	3	12
1	2L		2	1	13
2	2L		2	4	6
3	2L		2	2	20
1	2A		2	1	25
2	2A		2	1	0
3	2A		2	1	5
1	3L		2	1	4
2	3L		2	0	2
3	3L		2	1	0
1	3A		2	2	18
2	3A		2	2	5
3	3A		2	1	2
1	3A		2	1	6
2	1L		3	1	0
3	1L		3	2	6
1	1L		3	1	4
2	1A		3	2	0
3	1A		3	1	12
1	1A		3	1	3
2	2L		3	1	2
3	2L		3	2	6
1	2L		3	2	5
2	2A		3	1	4
3	2A		3	3	3
1	2A		3	0	0
2	3L		3	1	4
3	3L		3	3	30
1	3L		3	3	6
2	3A		3	0	12
3	3A		3	0	0
1	3A		3	1	5
2	1L		4	1	20

2	1L	4	3	21
3	1L	4	1	0
1	1A	4	0	0
2	1A	4	1	2
3	1A	4	1	4
1	2L	4	0	24
2	2L	4	0	6
3	2L	4	0	0
1	2A	4	1	3
2	2A	4	1	3
3	2A	4	1	0
1	3L	4	1	1
2	3L	4	0	0
3	3L	4	0	0
1	3A	4	1	10
2	3A	4	1	8
3	3A	4	2	18
1	1L	5	1	30
2	1L	5	0	4
3	1L	5	0	12
1	1A	5	1	18
2	1A	5	1	8
3	1A	5	1	0
1	2L	5	2	10
2	2L	5	1	0
3	2L	5	2	0
1	2A	5	1	5
2	2A	5	2	0
3	3A	5	1	3
1	3L	5	0	4
2	3L	5	1	10
3	3L	5	2	24
1	3A	5	0	24
2	3A	5	1	20
3	3A	5	1	14
1	1L	6	2	4
2	1L	6	1	0
3	1L	6	1	0
1	1A	6	1	3
2	1A	6	1	2
3	1A	6	1	3
1	2L	6	1	0
2	2L	6	2	6
3	2L	6	1	10
1	2A	6	0	0
2	2A	6	1	0
3	3A	6	2	3
1	3L	6	1	0
2	3L	6	1	4
3	3L	6	0	24
1	3A	6	3	21
2	3A	6	1	7
3	3A	6	1	12
1	1L	7	1	7
2	1L	7	1	12
3	1L	7	1	0
1	1A	7	1	27
2	1A	7	1	10

3	1A	7	1	0
1	2L	7	0	0
1	2L	7	1	8
2	2L	7	2	0
3	2A	7	1	21
1	2A	7	1	6
2	2A	7	1	0
3	3L	7	1	0
1	3L	7	1	30
2	3L	7	1	16
3	3A	7	1	8
1	3A	7	2	12
2	3A	7	1	6
3	1L	8	2	3
1	1L	8	0	0
2	1L	8	3	0
3	1A	8	2	0
1	1A	8	1	3
2	1A	8	2	6
3	2L	8	2	24
1	2L	8	2	4
2	2L	8	1	0
3	2A	8	0	0
1	2A	8	0	18
2	2A	8	1	0
3	3L	8	1	12
1	3L	8	4	0
2	3L	8	3	18
3	3A	8	2	21
1	3A	8	1	4
2	3A	9	0	0
3	1L	9	0	0
1	1L	9	3	3
2	1L	9	3	3
3	1A	9	1	4
1	1A	9	0	6
2	1A	9	0	20
3	2L	9	1	4
1	2L	9	2	3
2	2L	9	11	2
3	2A	9	2	4
1	2A	9	1	1
2	2A	9	3	12
3	3L	9	3	0
1	3L	9	1	0
2	3L	9	1	10
3	3A	9	1	30
1	3A	9	1	10
2	3A	9	1	4

1,2,3 =Cultivares samantha cirstaline y peach.

L,A =explantes apicales y larterales

1,2,3,4,5,6,7,8,9, = combinaciones de hormonas de ANA y BAP

Cuadro 21. Tabla de toma de datos en la fase de enraizamiento.

Rep.	Cultivar	Explante	concentración	#de raíces	Log.de raíces	
1		1L		1	5	1.3
2		1L		1	1	1.5
3		1L		1	2	1
4		1L		1	3	0.7
5		1L		1	1	0.5
1		1A		1	0	0
2		1A		1	0	0
3		1A		1	1	0
4		1A		1	1	0.5
5		1A		1	0	0
1		1L		2	1	0
2		1L		2	4	0
3		1L		2	0	0.1
4		1L		2	0	0.5
5		1L		2	1	0.6
1		1A		2	2	4
2		1A		2	0	0
3		1A		2	0	0.4
4		1A		2	0	0
5		1A		2	0	0
1		1L		3	0	0
2		1L		3	0	0
3		1L		3	0	0
4		1L		3	2	0
5		1L		3	1	0
1		1A		3	4	1.3
2		1A		3	1	2
3		1A		3	3	4.5
4		1A		3	2	0
5		1A		3	1	1
1		2L		1	2	0.7
2		2L		1	0	1.4
3		2L		1	0	2
4		2L		1	0	1
5		2L		1	0	0
1		2A		1	2	1.8
2		2A		1	1	0.5
3		2A		1	1	0
4		2A		1	3	1.8
5		2A		1	1	0.5
1		2L		1	3	0
2		2L		2	1	2
3		2L		2	2	1.3
4		2L		2	0	3
5		2L		2	1	0.8
1		2A		2	2	0.5
2		2A		2	1	0.6
3		2A		2	0	0
4		2A		2	0	0
5		2A		2	0	0
1		2L		2	0	0
2		2L		3	0	0
3		2L		3	2	0
4		2L		3	3	0

5	2 L	3	1	0
1	2 A	3	2	0
2	2 A	3	0	0
3	2 A	3	0	0
4	2 A	3	0	0
5	2 A	3	0	0
1	3 L	3	1	0
2	3 L	1	2	3
3	3 L	1	2	1
4	3 L	1	1	0
5	3 L	1	3	0.5
1	3 A	1	4	0
2	3 A	1	0	0.8
3	3 A	1	1	0.3
4	3 A	1	2	1.8
5	3 A	1	4	1.5
1	3 L	1	3	0
2	3 L	2	2	1.7
3	3 L	2	1	0
4	3 L	2	0	0.6
5	3 L	2	0	0
1	3 A	2	0	0
2	3 A	2	0	2.4
3	3 A	2	1	1
4	3 A	2	2	0.5
5	3 A	2	0	2.3
1	3 L	2	0	0.4
2	3 L	3	0	0
3	3 L	3	1	0
4	3 L	3	0	2.3
5	3 L	3	2	0
1	3 A	3	1	0
2	3 A	3	3	0
3	3 A	3	4	0
4	3 A	3	1	0
5	3 A	3	0	0

1,2,3,4,5 =Repeticiones

1,2,3 = Concentraciones de AIA.

A,L = Explantes lateral y Apical

1,2,3 = Cultivares (samantha,cristaline y peach)



FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGRONOMICAS

LA TESIS TITULADA: "RESPUETA DE TRES CULTIVARES DE ROSAL (Rosa sp.) VARIEDADES SAMANTHA, CRISTALINE Y PEACH, A LA MULTIPLICACION Y ENRAIZAMIENTO DE BROTES In vitro EN DIFERENTES PROPORCIONES DE AUXINAS CITOCININAS".

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: GERMAN AVIGAIL PORTILLO PAZOS

CARNET No: 8515689

HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Manuel Martínez Ovalle
Ing. Agr. José H. Calderón Díaz

El Asesor y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha cumplido con las normas Universitarias y Reglamentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

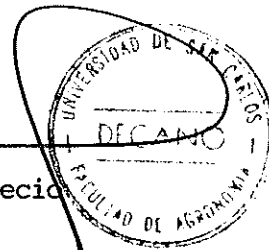
Ing. Agr. Domingo Amador Pérez
A S E S O R

Ing. Agr. Fernando Rodríguez
DIRECTOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS
DIRECCION



I M P R I M A S E

Ing. Agr. Rolando Lara Alecio
D E C A N O



cc:Control Académico
Archivo
FR/prr.

APARTADO POSTAL 1545 § 01091 GUATEMALA, C. A.
TELEFONO 476-9794 § FAX (502) 476-9770
E-mail: lia@usac.edu.gt § <http://www.usac.edu.gt/facultades/agronomia.htm>