



**Evaluación de medios de cultivo para la producción *in vitro* de *Rosa* sp. variedad Natal
Briar con fines comerciales**

Lizeth Alejandra Galeano Marín

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniera Bioquímica

Asesor

Ana María Henao Ramírez, Magister (MSc) en Biotecnología

Universidad de Antioquia
Facultad de Ingeniería
Ingeniería Bioquímica
El Carmen de Viboral, Antioquia, Colombia
2022

Cita	(Galeano Marín, 2022)
Referencia	Galeano Marín, L. A.(2022). <i>Evaluación de medios de cultivo para la producción in vitro de Rosa sp. variedad Natal Briar con fines comerciales</i> . [Pregrado]. Universidad de Antioquia, Colombia.
Estilo APA 7 (2020)	



Sede de Desarrollo Tecnológico e Innovación de la Universidad de Antioquia
Directora de operaciones Biofábrica: Blanca Mercedes Leguízamo Betancourth
Técnica *in vitro*: Marleny Cardona Ríos
Asesor: Ana María Henao Ramírez



Biblioteca Seccional Oriente (El Carmen de Viboral)

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes.

Decano/Director: Jesús Francisco Vargas Bonilla.

Jefe departamento: Lina María González Rodríguez.

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Dedicatoria

A mis padres, por su amor incondicional y apoyo en cada etapa de mi vida; por aquellos cafés en la madrugada mientras estudiaba; por cada abrazo oportuno y palabra de aliento; por hacer de mí un ser integral. Sin duda alguna este logro no habría sido posible sin ustedes.

Agradecimientos

A la Sede de Desarrollo Tecnológico e Innovación de la UdeA, por integrarme como parte de su equipo de trabajo y permitir el aprendizaje, más allá de lo técnico, de la calidad humana de sus integrantes.

A la Universidad de Antioquia por formarme como profesional integral y propiciar los espacios para conocer personas maravillosas que han pasado o permanecido a lo largo de este ciclo formativo.

A todas las personas que aportaron directa o indirectamente a hacer este sueño realidad.

Tabla de contenido

Resumen	8
Abstract	9
Introducción	10
1. Objetivos	12
1.1 Objetivo general	12
1.2 Objetivos específicos	12
2. Marco teórico	13
3. Metodología	14
Fase 0: Selección del Material parental.	14
Fase I: Introducción	15
Fase II: Multiplicación	17
Fase III: Enraizamiento	18
Fase IV: Endurecimiento	19
Análisis estadístico	20
4. Resultados	21
5. Discusión	27
6. Conclusiones	29
Referencias	31

Lista de tablas

Tabla 1	Composición medio de cultivo de introducción.....	16
Tabla 2	Condiciones ambientales de cámaras de crecimiento	17
Tabla 3	Composición medios de cultivo de multiplicación	17
Tabla 4	Composición medios de cultivo de enraizamiento.....	18
Tabla 5	Tratamientos fase de enraizamiento.....	19
Tabla 6	Efecto del medio de cultivo sobre el coeficiente de multiplicación.....	24
Tabla 7	Efecto de los tratamientos en la elongación de las plántulas en condiciones ex vitro	26

Lista de figuras

Figura 1. Diferentes fases de la producción de plántulas de Rosa sp. var. Natal Briar a escala de Biofábrica	14
Figura 2. Yemas de Rosa sp.var Natal Briar: a,b y c. no aptas para introducción; d, e y f, aptas para introducción.....	21
Figura 3. Porcentaje de plántulas de Rosa var Natal Briar desarrolladas en las cámaras de crecimiento No. 3 y No. 4	22
Figura 4. Síntomas de clorosis en plántulas de Rosa var Natal Briar en las cámaras de crecimiento No. 3 y No. 4 durante la fase de multiplicación. a) Porcentaje plantas con clorosis. b) Síntomas de clorosis en plántula de rosa.....	22
Figura 5. Algunos tipos de contaminación en cultivo: a, b y c, por bacterias; d, e y f, por hongos	23
Figura 6. Resultados fase de introducción de Rosa var Natal Briar de dos establecimientos diferentes: a) ROS-01-E y b) ROS-01-F.....	23
Figura 7. Porcentaje de plántulas obtenidas en cada medio de multiplicación que cumplieron o no con la elongación requerida para la fase de enraizamiento.....	24
Figura 8. Plántulas en fase de aclimatación en sustrato a los a) 0 y, b) 17 días.....	25

Siglas, acrónimos y abreviaturas

AIB	Ácido 3-Indolbutírico
ANA	Ácido Naftalenacético
ANOVA	Análisis de Varianza
BA	Bencilamonopurina
DCA	Diseño Completamente al Azar
LSD	Diferencias Menos Significativas
M&S	Murashige & Skoog
M1	Medio 1
M2	Medio 2
M3	Medio 3
MSc	Magister Scientiae
PGR	Reguladores de Crecimiento Vegetal
PPFD	Densidad de Flujo de Fotones Fotosintéticos
PTC	Plant Tissue Culture
T1	Tratamiento 1
T2	Tratamiento 2
T3	Tratamiento 3
T4	Tratamiento 4
UdeA	Universidad de Antioquia
Var.	Variedad
WPM	Woody Plant Medium

Resumen

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ha tenido un rol muy importante en la obtención a escala industrial de plantas sanas provenientes de ejemplares con características deseadas gracias a técnicas como la micropropagación. Sin embargo, el establecimiento de un medio de cultivo adecuado y las condiciones ambientales al interior del laboratorio son vitales para el establecimiento de procesos efectivos de propagación y esto se convierte en un reto mayor cuando se trata de la propagación masiva con fines comerciales en una Biofábrica de plantas. En el presente trabajo se evaluaron diferentes medios de cultivo para la propagación *in vitro* de *Rosa* sp. var. Natal Briar en sus etapas de multiplicación y enraizamiento, empleando yemas apicales y laterales para la producción a escala comercial en la Biofábrica de Plantas de la Sede de Desarrollo Tecnológico e Innovación de la Universidad de Antioquia. Para esto, se realizó un diseño completamente al azar evaluando tres medios de cultivo (M1, M2 y M3) en la fase de multiplicación con ocho réplicas de tres plántulas por réplica. Se calculó el coeficiente de multiplicación por medio y se estableció una altura mínima de tallo para llevar las vitroplántulas a fase de enraizamiento. Solo M1 no cumplió este criterio. Los individuos de M2 y M3 fueron distribuidos en dos medios de enraizamiento estableciendo cuatro tratamientos (T1, T2, T3 y T4). Se midió la elongación de los tallos de cada tratamiento en la fase de endurecimiento. En general, no se halló diferencia significativa entre los tratamientos evaluados en ambas fases, multiplicación y endurecimiento ($p < 0,05$). En promedio se obtuvo un coeficiente de multiplicación de 1,5 y 1,4 cm en la elongación de los tallos. En conclusión, los medios de cultivo evaluados en cada fase a pesar de no presentar diferencia permitieron un desarrollo foliar y longitudinal adecuado para el proceso productivo.

Palabras clave: cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, ornamentales, organogénesis, reguladores de crecimiento vegetal.

Abstract

In vitro culture of plant tissues has played a very important role in obtaining healthy plants from specimens with desired characteristics on an industrial scale thanks to techniques such as micropropagation. However, the establishment of a suitable culture medium and the environmental conditions inside the laboratory are vital for the establishment of effective propagation processes and this becomes a major challenge when it comes to mass propagation for commercial purposes in a plant biofactory. In the present work, different culture media were evaluated for the *in vitro* propagation of *Rosa* sp. var. Natal Briar in its multiplication and rooting stages, using apical and lateral buds for commercial-scale production in the Plant Biofactory of the Headquarters of Technological Development and Innovation of the University of Antioquia. For this, a completely random design was carried out evaluating three culture media (M1, M2 and M3) in the multiplication phase with eight replicates of three plantlets per replicate. Only M1 did not meet this criterion. The individuals of M2 and M3 were distributed in two rooting media establishing four treatments (T1, T2, T3 and T4). The elongation of the stems of each treatment was measured in the hardening phase. Overall, no significant difference was found between the treatments evaluated in both phases, multiplication and hardening ($p < 0.05$). On average, a multiplication coefficient of 1.5 and 1.4 cm was obtained in the elongation of the stems. In conclusion, the culture media evaluated in each phase despite not presenting difference allowed a foliar and longitudinal development suitable for the production process.

Keywords: *in vitro* culture of plant tissues, ornamentals, organogenesis, plant growth regulators.

Introducción

La rosa (*Rosa* sp.) es una especie leñosa muy atractiva no solo en el campo ornamental sino también en la industria cosmética y alimentaria (Hamama et al., 2019), su demanda, principalmente en el mercado internacional constituye un importante cultivo en Colombia (Villa & Arbeláez, 2019). Usualmente, los productores injertan las flores en portainjertos compatibles con el fin de aumentar el rendimiento en la producción (Davoudi et al., 2019). Los patrones de variedades de rosa como Natal Briar, Manetti y Major han sido recomendadas por su capacidad de resistencia a plagas y enfermedades, aclimatación en invernaderos y mejorar las cualidades de las plantas injertadas (Arion et al., 2020; Kwon et al., 2022). Entre estas, la variedad Natal Briar ha sido ampliamente usada por mostrar, además, alto enraizamiento, la posibilidad de una regeneración más rápida después del corte, la capacidad de adaptarse a diferentes medios de cultivo y la alta resistencia a las enfermedades de la raíz (Shaafi et al., 2022).

Comercialmente, la propagación de la rosa se realiza por semillas, estacas, injertos de varetas y, principalmente, injertos de yema (Villa & Arbeláez, 2019). Sin embargo, también existen otras técnicas como el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales que permiten obtener un mayor número de plantas clonales, libres de plagas y enfermedades e independiente de las fluctuaciones de las condiciones ambientales (Villa & Arbeláez, 2019). De estas técnicas se destaca la micropropagación, que hace uso de la organogénesis y la embriogénesis somática para la propagación clonal de plantas en recipientes cerrados bajo condiciones asépticas en cortos períodos de tiempo y espacios limitados (Roberts & Schum, 2003).

Generalmente, en rosas, la micropropagación se da a través de la proliferación de las células meristemáticas de las yemas apicales o yemas laterales de los segmentos nodales, este tipo de células regeneran en múltiples brotes sin ninguna fase de callo intermedia (Pati et al., 2006). La eficiencia de este tipo de propagación está dada por el número de plantas obtenidas, el cual se determina por el número de yemas axilares preexistentes en el explante, posibilitando producir más de una planta por explante sembrado (Paz, 2000).

No obstante, la contaminación de medios de cultivo, necrosis, pardeamiento y clorosis de tejidos, la vitrificación, adaptación a las condiciones *in vitro*, entre otros, son algunos retos debidos la mayoría a razones técnicas, biológicas o genéticas que deben ser superados en el cultivo *in vitro*

de tejidos vegetales estableciendo un protocolo adecuado para cada especie según sus requerimientos (Abdalla et al., 2022).

Para el desarrollo de los bionegocios de la Sede de Desarrollo Tecnológico e Innovación de La Universidad de Antioquia es necesario ajustar y facilitar la viabilidad de los productos resultado de la propagación *in vitro*. En este sentido y con el fin de aumentar la oferta de variedades ornamentales surge la necesidad de aumentar la producción de vitroplantas de rosa (*Rosa* sp. var Natal Briar). De esta manera, en el presente trabajo se evaluaron diferentes medios de cultivo en la fase de multiplicación y enraizamiento basados en un protocolo preexistente. Los resultados de esta investigación permitieron contribuir a mediano plazo en el establecimiento de un sistema de producción masivo de rosas var. Natal Briar de alta calidad fisiológica.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar la propagación *in vitro* de *Rosa sp.* var. Natal Briar en la etapa de multiplicación por yemas apicales laterales y en la etapa de enraizamiento.

1.2 Objetivos específicos

- Evaluar la influencia de diferentes medios de cultivo sobre el desarrollo de vitroplantas de la especie *Rosa sp.* var. Natal Briar en fase de multiplicación y enraizamiento.
- Determinar el efecto de las condiciones ambientales *in vitro* en el desarrollo fisiológico de plántulas de la especie *Rosa sp.* var. Natal Briar
- Comparar el porcentaje de supervivencia y la respuesta en campo de las vitroplántulas endurecidas según sus tratamientos *in vitro*.

2. Marco teórico

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se puede definir como un conjunto heterogéneo de técnicas que permiten cultivar en condiciones asépticas células, tejidos y órganos vegetales, llamados explantes, en un medio de cultivo artificial de composición química definida y bajo condiciones ambientales controladas (Mroginski et al., 2010). El medio de cultivo incluye la formulación de sales minerales, vitaminas, azúcares y promotores/reguladores de crecimiento vegetal; la combinación y proporción de diferentes hormonas incidirá en la formación, crecimiento y/o desarrollo de órganos y tejidos de la planta (Roberts & Schum, 2003).

La producción de vitroplántulas inicia con la elección de los explantes, seguido de la introducción *in vitro* con la desinfección de los tejidos e inducción del proceso morfogénico, ya sea organogénico o embriogénico hasta lograr el desarrollo completo de las plantas que se desean producir (Alcaraz, 2021). Las aplicaciones prácticas de las técnicas de micropropagación son muy amplias, en países latinoamericanos como Costa Rica, Argentina, Cuba y Colombia se está empleando en la producción comercial a escala industrial en infraestructuras especializadas como las Biofábricas o laboratorios comerciales de vitroplántulas. Entre las principales ventajas de la producción industrial de vitroplántulas está la multiplicación rápida, en tiempo corto y espacio reducido (Alcaraz, 2021) .

En rosas, la propagación *in vitro* ha jugado un rol muy importante en la multiplicación rápida de cultivares con características deseables y producción de plantas sanas y libres de enfermedades (Pati et al., 2006). Sin embargo, muchos cultivos de rosa han mostrado desórdenes fisiológicos como senescencia temprana de las hojas y muy baja tasa de multiplicación bajo condiciones *in vitro* (Matos et al., 2021). La formulación de medios de cultivo ha sido ampliamente estudiada en esta especie leñosa con el fin de dar solución a los problemas anteriormente mencionados. Villa et al. (2019) formularon medios con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento en el desarrollo de *Rosa* sp.; el medio que contenía 2 mg L⁻¹ de bencilaminopurina (BA) y 3 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) fue propicio para la multiplicación y enraizamiento de la planta. Roberts et al. (2003) recomienda el uso de gluconato de calcio para disminuir la necrosis e hiperhidratación del tejido vegetal de rosas. Matos et al. (2021) estimularon la inducción de brotes empleando 2 mg L⁻¹ de AgNO₃.

3. Metodología

El proyecto se llevó a cabo en 5 fases: Fase 0: Selección del material parental; Fase I: Introducción; Fase II: Multiplicación; Fase III: Enraizamiento; Fase IV: adaptación *ex vitro*, como se ilustra en la Figura 1.

Fase 0: Selección del Material parental.

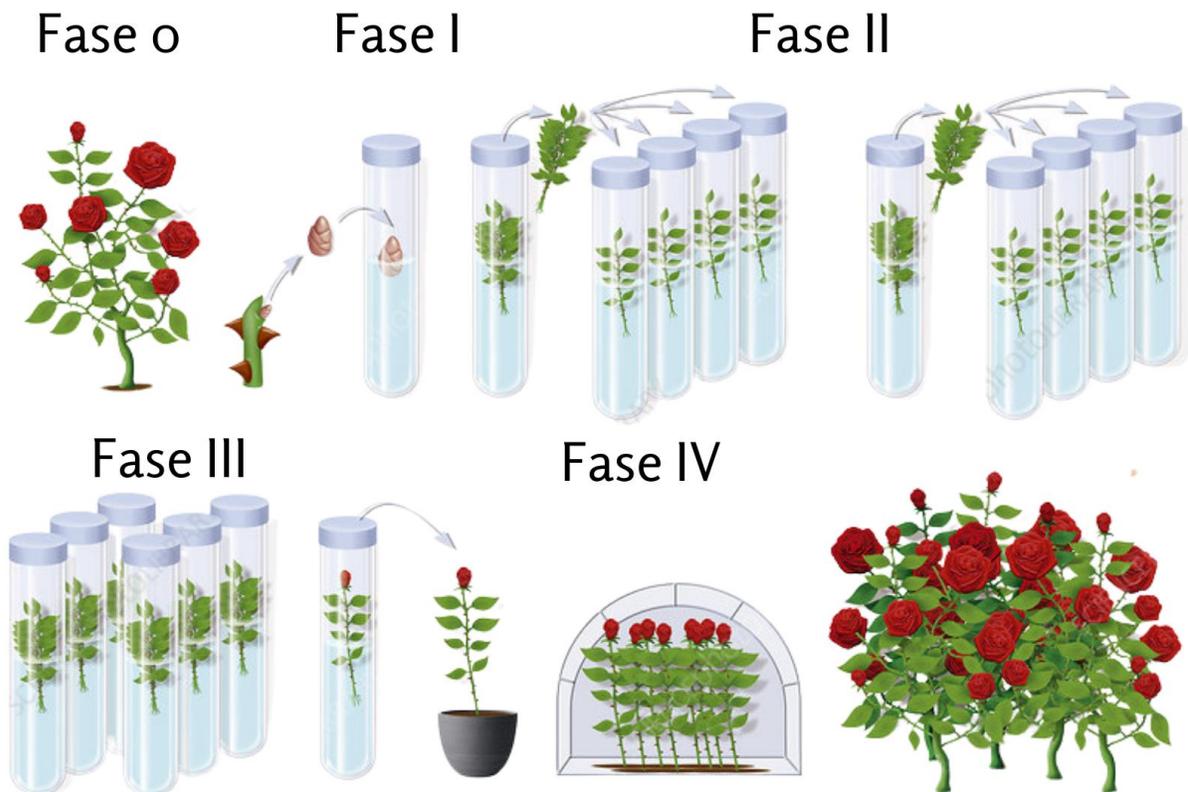


Figura 1. Diferentes fases de la producción de plántulas de Rosa sp. var. Natal Briar a escala de Biofábrica

El material vegetal de partida fue tomado de plantas obtenidas previamente en el laboratorio a partir de esquejes libres de *Agrobacterium tumefaciens* enviados por la empresa Florval Sede Florval en Chía, Cundinamarca y que ya se encontraban endurecidas en condiciones de invernadero.

Fase I: Introducción

En primera instancia se hizo una inspección visual del estado fisiológico de los esquejes provenientes de plantas madre; se seleccionaron los entrenudos que presentaron una yema viable y se clasificó el material entre joven y leñoso. Los esquejes adecuados fueron seccionados y deshojados procurando no dañar las yemas laterales ni las apicales, esto basado en experiencias previas durante la estandarización del protocolo.

El proceso de desinfección se llevó a cabo en el área de producto terminado de la Sede, allí se lavó el material vegetal con jabón líquido $0,5 \text{ cm L}^{-1}$ y se agitó manualmente durante 5 minutos para remover impurezas como sustrato, principalmente. Después, se enjuagó con abundante agua hasta retirar los residuos de jabón.

Posteriormente, y en cabina de flujo laminar, el material se sumergió en etanol al 70% y se agitó manualmente durante 1 min. El alcohol se enjuagó con agua desionizada estéril. Luego, el material se sumergió en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% y Tween 20 (1 gota por litro) y se agitó manualmente durante 5 min. Finalmente, se realizó un triple lavado con agua desionizada estéril para remover el exceso de la solución desinfectante.

En el proceso de siembra, se empleó un estereomicroscopio dentro de la cabina de flujo laminar para retirar los meristemas apicales y/o laterales con el auxilio de cuchillas y pinzas. Los primordios foliares fueron retirados y los meristemas obtenidos se sembraron en medio de introducción previamente estandarizado en la Sede (Tabla 1). Esta siembra fue codificada como Ros-01-E según la codificación manejada durante los procesos productivos de la Sede.

Tabla 1*Composición medio de cultivo de introducción*

Componente	Concentración final
Sales macros M&S	4,26 g L ⁻¹
Sales micros M&S	0,1 g L ⁻¹
Vitaminas M&S	1 ml L ⁻¹
BA	0,2 mg L ⁻¹
Azúcar	30 g L ⁻¹
Agar PTC	5,8 g L ⁻¹
pH	5,6

* M&S: Murashige & Skoog; BA: Bencilaminopurina; Agar PTC: Agar Plant Tissue Culture

Todos los medios de cultivo fueron preparados con mínimo una semana de anticipación a su uso de la siguiente manera: se adicionaron todos los componentes menos el gelificante, se aforó al volumen deseado y se ajustó el pH adicionando HCl 1 M o NaOH 1 M según la necesidad. Seguidamente, se agregó el agar y se llevó a ebullición para su dilución. Luego, se dispensó el volumen de medio requerido en recipientes de vidrio; 3 mL de medio por tubo de ensayo para la siembra, y 20 mL por frasco de compota para las etapas de multiplicación y enraizamiento. Finalmente, se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 psi durante 20 min.

Cada meristemo fue sembrado individualmente por tubo de ensayo y fueron dejados en cuarto oscuro durante 15 días. Transcurrido este tiempo se trasladaron en partes iguales a las cámaras de crecimiento No.3 y No.4 las cuales tenían condiciones ambientales diferentes (Tabla 2). En ambas cámaras las plantas fueron mantenidas con fotoperiodo 16 h luz bajo iluminación LED durante 4 semanas.

Seguimiento: con el fin de reconocer la respuesta fisiológica de los explantes a diferentes condiciones ambientales, se realizó la inspección semanal del material vegetal. Se identificaron aquellos explantes que se diferenciaron y se descartaron aquellos que presentaban contaminación, oxidación y/o necrosis.

Tabla 2*Condiciones ambientales de cámaras de crecimiento*

Parámetro	Cámara No.3	Cámara No.4
Temperatura (°C)	18 - 20	20 – 22
Humedad relativa (%)	30 - 55	35 – 70
PPFD ($\mu\text{mol s m}^{-2}$)	17,33	19,91

*PPFD: densidad de flujo de fotones fotosintética

Fase II: Multiplicación

En esta fase se realizó un diseño completamente al azar (DCA) para evaluar la respuesta de los explantes a diferentes (3) medios de cultivo (ver tabla 3). Las plántulas establecidas en la fase anterior fueron distribuidas aleatoriamente y en misma proporción en los medios de cultivo de multiplicación. La unidad experimental inicial fue definida como un frasco de compota con tres plántulas en su interior. En total se establecieron 24 unidades experimentales las cuales fueron dejadas en la cámara de crecimiento N.4.

Tabla 3*Composición medios de cultivo de multiplicación*

Componente	Concentración final		
	Medio 1	Medio 2	Medio 3
WPM	2,3 g L ⁻¹	2,3 g L ⁻¹	2,3 g L ⁻¹
Vitaminas M&S	1 ml L ⁻¹	1 ml L ⁻¹	1 ml L ⁻¹
BA	2 mg L ⁻¹	0,2 mg L ⁻¹	0,2 mg L ⁻¹
ANA	0,1 mg L ⁻¹	0,1 mg L ⁻¹	0,1 mg L ⁻¹
Azúcar	30 g L ⁻¹	30 g L ⁻¹	30 g L ⁻¹
Agar PTC	5,5 g L ⁻¹	5,5 g L ⁻¹	5,5 g L ⁻¹
Gluconato de calcio	-	-	2,5 g L ⁻¹
pH	5,6	5,6	5,6

* WPM: Lloyd & McCown Woody Plant Basal Salt

Esta etapa tuvo una duración de 6 semanas conformada por 2 subcultivos realizados con una duración de 3 semanas cada uno. Se realizó el seguimiento a la formación de brotes y elongación de los tallos. Los explantes contaminados fueron descartados.

Variables respuestas a medir en la fase de multiplicación:

Se realizó un enfoque cuantitativo donde las variables respuesta fueron el coeficiente de multiplicación y la longitud tallo. El coeficiente de multiplicación se determinó como:

$$\text{Coeficiente de multiplicación} = \frac{\text{número de brotes formados}}{\text{número de explantes introducidos}} \quad (1)$$

Fase III: Enraizamiento

De las plántulas que se desarrollaron en los medios M2 y M3 se tomaron aquellas que tenían al menos 1,5 cm de altura para transferirlas a los medios de enraizamiento e inducir la formación de raíces. El número de individuos obtenido en cada medio de multiplicación fue distribuido aleatoriamente en los dos (2) medios de cultivo de enraizamiento (ver Tabla 4) siendo formados 4 tratamientos (Tabla 5). Fueron utilizadas las mismas condiciones de cultivo detalladas en la fase anterior y se realizó seguimiento al desarrollo radicular en estas plantas.

Tabla 4

Composición medios de cultivo de enraizamiento

Componente	Concentración final	
	Medio 1	Medio 2
WPM	2,3 g L ⁻¹	2,3 g L ⁻¹
Vitaminas M&S	1 ml L ⁻¹	1 ml L ⁻¹
AIB	0,1 mg L ⁻¹	0,1 mg L ⁻¹
ANA	0,1 mg L ⁻¹	-
Azúcar	30 g L ⁻¹	30 g L ⁻¹
Agar PTC	5,5 g L ⁻¹	5,5 g L ⁻¹
pH	5,6	5,6

AIB: ácido 3-indol-butírico

Tabla 5*Tratamientos fase de enraizamiento*

Medio multiplicación	Medio enraizamiento	
	Medio 1	Medio 2
M2	T1	T2
M3	T3	T4

T1: tratamiento 1; T2: tratamiento 2; T3: tratamiento 3; T4: tratamiento 4;

Pasados 15, 20 y 30 días de la siembra en los medios de enraizamiento se realizó la inspección visual de las vitroplantas para verificar la formación o no de raíces. Finalizada esta etapa todas fueron llevadas a endurecimiento para observar la influencia de estos medios en el desarrollo de la planta en campo.

Variables respuestas a medir en la fase de enraizamiento: se tuvo un enfoque cualitativo relacionado con la presencia o no de sistema radicular bien formado.

Fase IV: Endurecimiento

Las vitroplantas enraizadas fueron trasladadas al área de producto terminado para lavar cuidadosamente sus raíces con agua del grifo con el fin de retirar el exceso de medio de cultivo. Posteriormente, las plantas se llevaron al área de invernaderos para realizar la respectiva siembra en bandejas de germinación de 50 pozos con turba manteniéndolas separadas según el tratamiento respectivo. Estas plantas fueron mantenidas en cámara húmeda en condiciones de invernadero durante 2 semanas, aproximadamente. Pasadas estas dos semanas se evaluó la sobrevivencia y crecimiento de las plantas.

Variables respuestas a medir en la fase de adaptación *ex vitro*: se realizó un enfoque mixto, cuantitativo para las variables altura de la planta y número de hojas; y cualitativo para el porcentaje de supervivencia.

Análisis estadístico

Se realizó un diseño completamente al azar (DCA) y por medio del software R Studio (2022.07.2), los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y diferencia de medias menos significativa de Fisher (LSD) con un $p < 0,05$. También se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos cuando no se cumplieron los supuestos de normalidad.

4. Resultados

Durante la fase de introducción fue posible la obtención de una mayor cantidad de yemas viables en las ramas más jóvenes, las cuales se caracterizaban por la flexibilidad de sus tallos al ser comparadas con aquellas ramas que estaban más leñosas. Este proceso permitió identificar el estado óptimo del material vegetal inicial que se debe utilizar para la introducción *in vitro* de esta variedad. La Figura 2 muestra el estado de yemas que no son aptas para la introducción *in vitro* de *Rosa* var. Natal Briar y aquellas que permiten la obtención exitosa de vitroplantas de esta especie.



Figura 2. Yemas de *Rosa* sp. var Natal Briar: a, b y c. no aptas para introducción; d, e y f, aptas para introducción.

De los meristemos exitosamente introducidos, no se observaron diferencias en la formación de hojas y elongación del vástago entre aquellos provenientes de esquejes jóvenes o leñosos. De igual forma, este desarrollo tampoco se vio influenciado en las primeras semanas por las condiciones ambientales de las cámaras de crecimiento donde se encontraban (Figura 3). Sin embargo, al cabo de las 6 semanas de establecimiento se evidenció clorosis en los tejidos de algunas

plántulas ubicadas en la cámara de crecimiento No. 3 (Figura 4), por lo cual todas las plantas fueron trasladadas para la cámara de crecimiento No. 4.

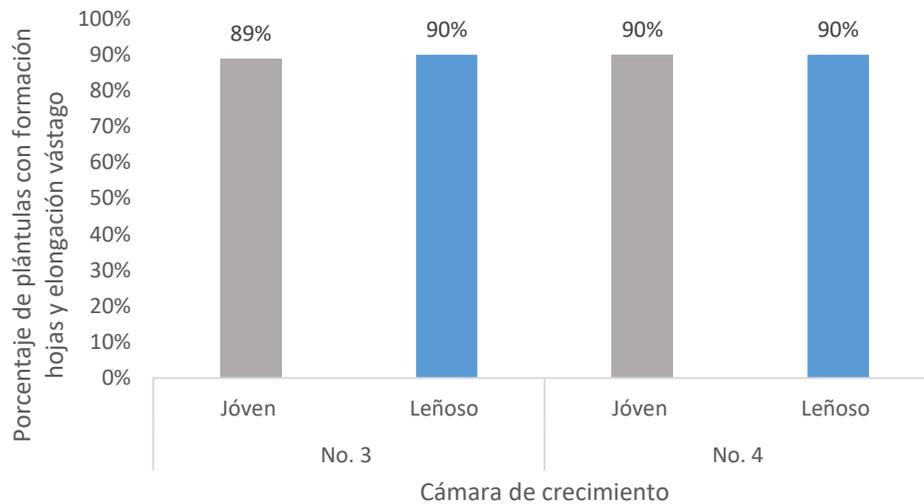


Figura 3. Porcentaje de plántulas de *Rosa* var Natal Briar desarrolladas en las cámaras de crecimiento No. 3 y No. 4

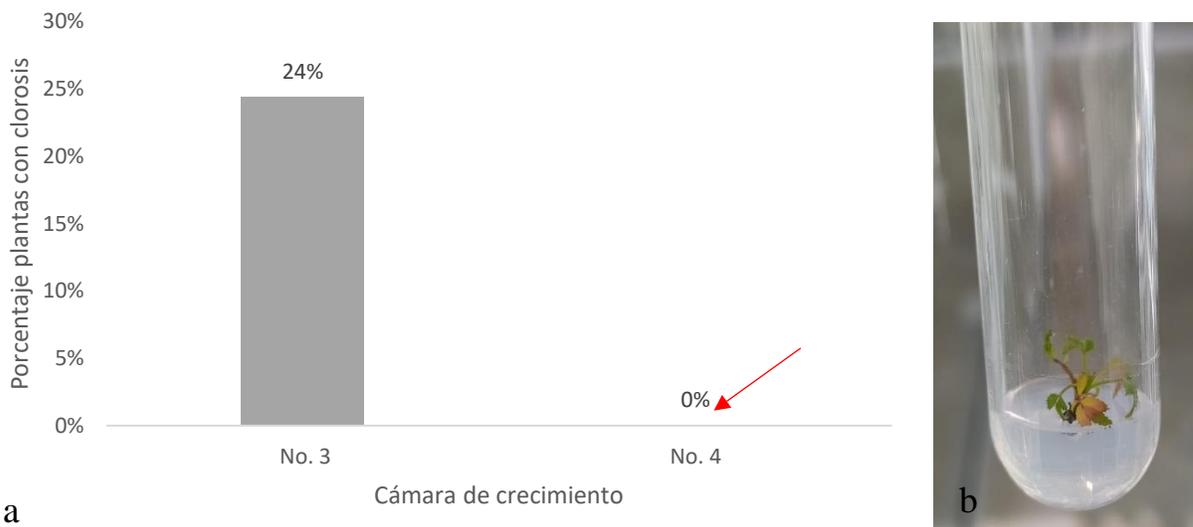


Figura 4. Síntomas de clorosis en plántulas de *Rosa* var Natal Briar en las cámaras de crecimiento No. 3 y No. 4 durante la fase de multiplicación. a) Porcentaje plantas con clorosis. b) Síntomas de clorosis en plántula de rosa.

Los tipos de contaminación más comunes en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales son debidos a bacterias (Shaafi et al., 2022) y hongos. En el presente trabajo, la contaminación fue debida únicamente a bacterias; detectable por la formación de un halo blanco al interior del medio, sobre la base del explante (Figura 5a) o formación de colonias en la superficie del medio (Figura 5.c). El porcentaje de supervivencia (58,8%) fue notablemente mayor en comparación con otras

introducciones de la misma especie realizadas previamente en la biofábrica (18,9%). Los resultados de la fase de introducción del presente trabajo (ROS-01-E) son comparados con la introducción Ros-01-F (no realizada en este estudio) en la Figura 6.

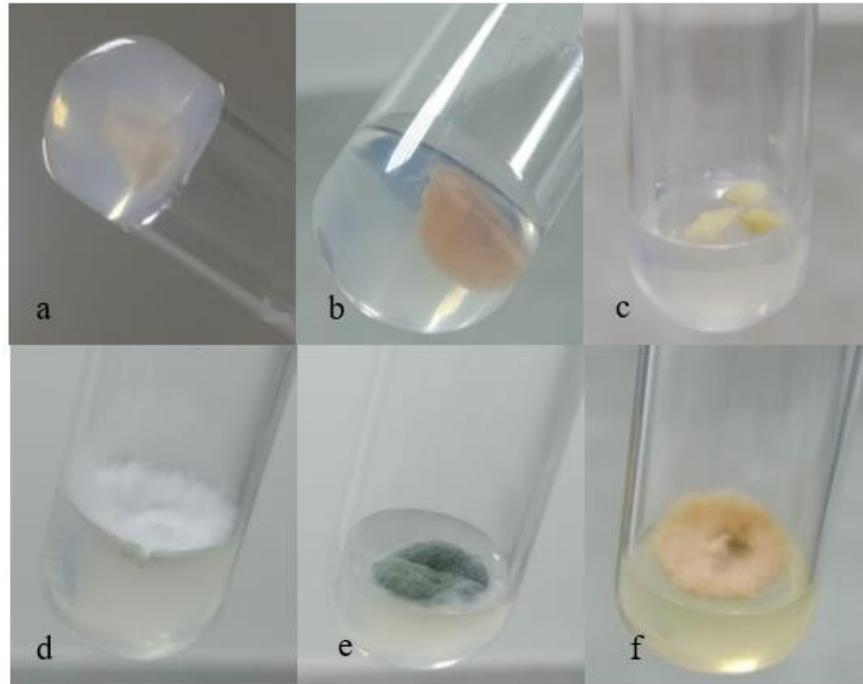


Figura 5. Algunos tipos de contaminación en cultivo: a, b y c, por bacterias; d, e y f, por hongos

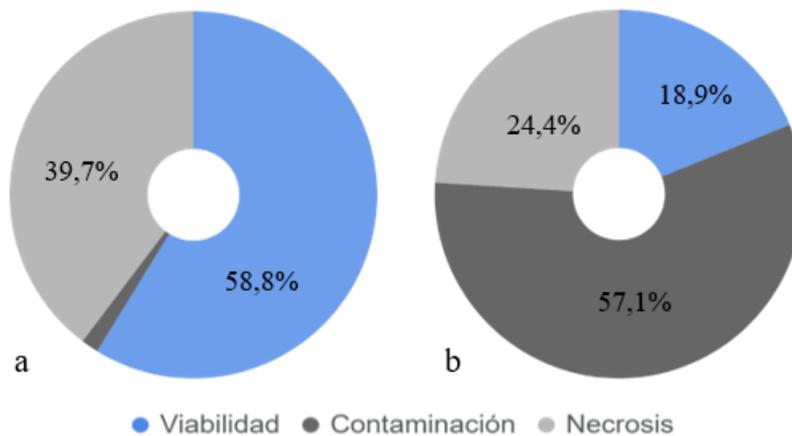


Figura 6. Resultados fase de introducción de Rosa var Natal Briar de dos establecimientos diferentes: a) ROS-01-E y b) ROS-01-F

En la fase de multiplicación se tomó como criterio de selección el coeficiente de multiplicación (Ec. 1), definido como número de brotes viables formados por número de explantes introducidos. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los medios (Tabla 6) por lo cual se tomó como segundo criterio la altura de las vitroplántulas. Las plántulas con al menos 1,5

cm de altura fueron llevadas a fase de enraizamiento. De los tres medios de cultivo de multiplicación el 100% de las unidades experimentales del primer medio, M1, no cumplieron con este criterio (Figura 7).

Tabla 6

Efecto del medio de cultivo sobre el coeficiente de multiplicación

Medio de cultivo	Coeficiente de multiplicación
Medio 1	1,72 a
Medio 2	1,50 a
Medio 3	1,33 a

Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,5$).

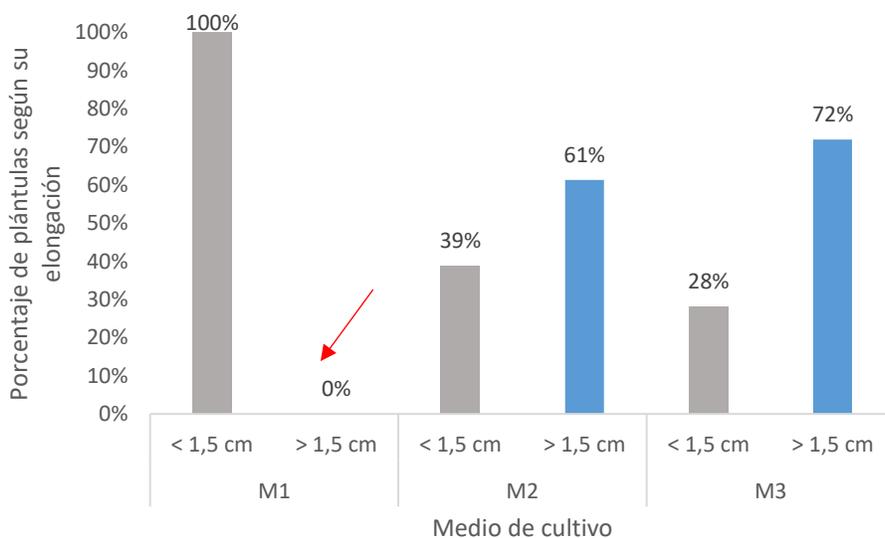


Figura 7. Porcentaje de plántulas obtenidas en cada medio de multiplicación que cumplieron o no con la elongación requerida para la fase de enraizamiento.

Sin embargo, a pesar de que el medio M1 no presentó ninguna plántula con la altura requerida para la fase de enraizamiento, sí presentó múltiple brotación de pequeño porte por explante. Queda por evaluar la respuesta de estas plántulas en un medio con menor concentración de BA para favorecer la elongación de los tallos. Por experiencias previas en la Sede se ha evidenciado que al separar estos brotes de corta elongación (< 1 cm) se induce la necrosis de todo el tejido y se pierde el material vegetal.



Figura 8. Plántulas en fase de aclimatación en sustrato a los a) 0 y, b) 17 días.

Todas las plántulas mostraron formación de por lo menos una raíz al paso de 6 semanas en medio de enraizamiento. En la etapa de endurecimiento, al cabo de dos semanas de endurecimiento, el 98% (datos no mostrados) de las unidades experimentales sobrevivieron. La Figura 8 muestra el progreso de las plantas en invernadero; en el recuadro rojo se encuentra la única plántula que fue descartada.

Finalmente, en relación al número de hojas y altura de las vitroplántulas durante su desarrollo en condiciones de invernadero, tampoco se halló diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos T1, T2, T3 y T4 (Tabla 7). El número de hojas no tuvo una distribución normal por lo cual se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos, no hubo diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 7*Efecto de los tratamientos en la elongación de las plántulas en condiciones ex vitro*

Tratamiento	Elongación (cm)
T1	1,59 a
T2	1,30 a
T3	1,28 a
T4	1,25 a

Los valores seguidos por la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes ($p < 0,5$).

5. Discusión

El propósito de esta investigación fue evaluar diferentes medios de cultivo y algunas condiciones ambientales con el fin de aumentar el número de brotes por explante (coeficiente de multiplicación) de *Rosa* sp. var Natal Briar. El seguimiento se realizó durante todas las fases de desarrollo de las plántulas hasta evidenciar su supervivencia en campo.

Los reguladores de crecimiento vegetal, también conocidos como fitohormonas, son compuestos orgánicos producidos naturalmente por las plantas para controlar el crecimiento y otras funciones fisiológicas (Katel et al., 2022); y que, en cultivo de tejidos, son adicionados al medio de cultivo para inducir la diferenciación de células madre o formación de órganos, según la necesidad.

BA es una citoquinina sintética que estimula la multiplicación de brotes (Roberts & Schum, 2003), lo que posiblemente explica la múltiple brotación de los explantes en el medio 1 (M1) formulado mayor concentración de esta hormona (2 mg L^{-1}). Sin embargo, estudios en otras especies leñosas recomiendan la combinación de citoquininas y auxinas para favorecer la formación y elongación de los brotes. Kim et al. (2015) evaluaron el efecto de reguladores de crecimiento en arándanos (*Vaccinium* sp.) y determinaron que las plántulas en los medios sin fitohormonas o con solo presencia de BA no presentaron formación de brotes. Hubner et al. (2007) establecieron una influencia positiva en la multiplicación de *Aspidosperma ramiflorum* (guatambu) cuando las combinaciones de BA y ANA contenían una mayor proporción de la primera que de la segunda.

El calcio es reportado como uno de los elementos involucrados en el incremento y mantenimiento de la calidad de algunas flores, como la rosa (Shaafi et al., 2022). Además, la deficiencia de calcio puede resultar en la necrosis y vitrificación de los tejidos vegetales. En la mayoría de los casos de siembra de rosa, la adición de calcio en forma de gluconato de calcio incrementa las tasas de multiplicación y elongación en la fase de multiplicación, y el número de raíces en la fase de enraizamiento (Roberts & Schum, 2003). En otros casos no tiene ningún efecto, tal como ocurrió en el presente estudio, donde no hubo diferencias significativas entre los medios.

Algunos síntomas como la clorosis o el pardeamiento de tejidos pueden ser respuesta de las plantas a condiciones de estrés: falta de nutrientes, condiciones ambientales, poca adaptación a las condiciones *in vitro*, entre otras. De manera específica, el pardeamiento de tejidos se debe a la

acumulación de melanina o compuestos fenólicos producidos por acción de enzimas oxidativas (polifenoloxidasas y peroxidasas) (Abdalla et al., 2022). La respuesta de las plantas en la cámara de crecimiento No.3 puede ser debida a las condiciones ambientales pero no es posible determinar si se debió a las compuestos mencionados anteriormente, sería preciso analizar estos tejidos o el medio de cultivo al final de esta fase para determinar su presencia o no y considerar el uso de antioxidantes en la formulación del medio.

6. Conclusiones

Los medios de cultivo evaluados en cada fase no presentaron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con los criterios de coeficiente de multiplicación y elongación del tallo adecuados para la viable comercialización de *Rosa* sp. var Natal Briar. Debido a esto, la empresa podrá seguir utilizando como base el medio de cultivo más económico para continuar con el proceso de estandarización de la propagación in vitro con el fin de obtener un mayor coeficiente de multiplicación.

Se pudo observar incidencia de las condiciones ambientales de las cámaras de crecimiento en el desarrollo de los tejidos vegetales, la clorosis de las plantas en fase de introducción permitió seleccionar el espacio propicio para el desarrollo de las vitroplantas.

Como no fueron observadas diferencias estadísticamente diferenciadas entre los dos medios de enraizamiento, se puede establecer como criterio el costo del medio para su selección. Adicionalmente, en base el apareamiento de raíces y al buen desarrollo durante la aclimatación se puede concluir que un tiempo de 15 días es suficiente para la aclimatación de esta variedad.

Las vitroplantas obtenidas en el laboratorio son capaces de sobrevivir a la fase de aclimatación y el respectivo endurecimiento puede ser realizado en bandejas de germinación con tapacúpula utilizando sustrato de turba durante 15 días. Esto permitirá a la empresa la venta tanto de vitroplantas en frasco como de plantas aclimatadas/endurecidas según solicitud del mercado.

7. Recomendaciones

Se recomienda a la empresa que la fase de multiplicación de la Rosa Natal Briar sea realizada en la cámara de crecimiento No. 4 ya que las vitroplantas se desarrollaron de forma más saludable en las condiciones de dicha cámara.

Como no fueron observadas diferencias estadísticamente diferenciadas entre los dos medios de enraizamiento, se recomienda a la empresa utilizar el medio más económico. Adicionalmente, en base al apareamiento de raíces y al buen desarrollo durante la aclimatación se puede concluir que un tiempo de 15 días es suficiente para la aclimatación de esta variedad.

Se recomienda hacer más estudios especialmente en la fase de multiplicación evaluando la combinación de reguladores de crecimiento entre citoquininas y auxinas para encontrar un punto aceptable entre la brotación y elongación de los tallos. Adicionalmente, de no conseguir aumentar el coeficiente de multiplicación por la vía de la micropropagación por meristemas, se sugiere revisar si la vía para esta variedad es la organogénesis o la embriogénesis somática (o revisar otro tipo de explantes). Esto, en caso de que la solicitud o la demanda de este material producido in vitro lo amerite.

De igual manera, se sugiere considerar la posibilidad de dividir esta fase en dos subetapas: el primer subcultivo empleando una concentración de BA alta, como en el medio de multiplicación M1; y la segunda, transfiriendo las plántulas a un medio con menor concentración de esta hormona, como los medios M2 o M3.

Referencias

- Abdalla, N., El-Ramady, H., Seliem, M. K., El-Mahrouk, M. E., Taha, N., Bayoumi, Y., Shalaby, T. A., & Dobránszki, J. (2022). An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. *Horticulturae*, 8(8), 677. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080677>
- Alcaraz Meléndez, L. (2021). How plant tissue culture helps the conservation and development of plants of economic interest Cómo el cultivo de tejidos vegetales ayuda a la conservación y desarrollo de plantas de interés económico. *Recursos Naturales y Sociedad*, 7(3). <https://doi.org/10.18846/renaysoc.2021.07.07.03.0011>
- Arion Loza, R. R., Tincon Mamani, E., & Poma Loza, E. (2020). Effect of hydrogen peroxide on the rooting of rose cuttings (*Rosa* sp.). *Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 7(2), 80–86. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S2409-16182020000200011&script=sci_arttext
- Davoudi Pahnekolayi, M., Tehranifar, A., Samiei, L., & Shoor, M. (2019). Optimizing culture medium ingredients and micrografting devices can promote in vitro micrografting of cut roses on different rootstocks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 137(2), 265–274. <https://doi.org/10.1007/S11240-019-01567-W/FIGURES/1>
- Hamama, L., Voisine, L., Pierre, S., Cesbron, D., Ogé, L., Lecerf, M., Cailleux, S., Bosselut, J., Foucrier, S., Foucher, F., Berruyer, R., Sakr, S., & Hibrand-Saint Oyant, L. (2019). Improvement of in vitro donor plant competence to increase de novo shoot organogenesis in rose genotypes. *Scientia Horticulturae*, 252, 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.03.040>
- Hubner, H. I., Silva, L. V. da, Capatti, I., Fumagali, E., Souto, E. R. de, Gonçalves, R. A. C., & Oliveira, A. J. B. de. (2007). Multiplicação &em>in vitro&em>; de &em>Aspidosperma ramiflorum&em>; Muell. Arg. (Apocynaceae). *Acta Scientiarum. Health Science*, 29(1). <https://doi.org/10.4025/actascihealthsci.v29i1.108>
- Katel, S., Mandal, H. R., Kattel, S., Yadav, S. P. S., & Lamshal, B. S. (2022). Impacts of plant growth regulators in strawberry plant: A review. *Heliyon*, 8(12), e11959. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11959>

- Kim, H. Y., Kang, S. P., Hong, S. J., & Eum, H. L. (2015). Influence of Medium and Plant Growth Regulator on Micropropagation Efficiency in Blueberry. *Protected Horticulture and Plant Factory*, 24(3), 167–172. <https://doi.org/10.12791/KSBEC.2015.24.3.167>
- Kwon, O.-H., Choi, H.-G., Kim, S.-J., & Kim, W.-H. (2022). Assessment of Four-Seasonal Quality and Yield of Cut Flower Roses Grafted onto Rosa Rootstocks. *Agriculture*, 12(11), 1848. <https://doi.org/10.3390/agriculture12111848>
- Matos, A. V. C. da S. de, Oliveira, B. S. de, Oliveira, M. E. B. S. de, & Cardoso, J. C. (2021). AgNO₃ improved micropropagation and stimulate in vitro fowering of rose (Rosa x hybrida) cv. Sena. *Ornamental Horticulture*, 27(1), 33–40. <https://doi.org/10.1590/2447-536X.V27I1.2161>
- Mroginski, L., Sansberro, P., & Flaschland, E. (2010). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. In G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hoop, & L. Mroginski (Eds.), *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II* (II, p. 17). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/47730652/bio_WEB-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1657592342&Signature=C4mP52~PJJ9eEoza6x9PsbtNulrYIN-p1ok6i-XOxxDqC0VrY1lp-j99dOQOkgimngqyLUVkOj9bhpSEv4kK-elfKdoVIBjJIgxtlwWhDBK9GVNE-JM1WYdk0UcMIZQpLFWaE0BdlQC4MeTS8kXgZ4--uojFb0sXFddayahJHO7RW6LhATDFIxyA9jfX2tZjWdkc70Qv~W6Y4S60q~VrhlZh~wsvsZ~O70bdmiWr3CFBTcv2VcYulrbhuz6twod6vbIxcoSarMDa9Gkzaf-URSt~yj0QLg~WYvNkj610U7v7Ka9FICnpBIRLF-YO9dRev8Mz~QvBUkdTFEWeyZm~Q__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA#page=18
- Pati, P. K., Rath, S. P., Sharma, M., Sood, A., & Ahuja, P. S. (2006). In vitro propagation of rose - A review. In *Biotechnology Advances* (Vol. 24, Issue 1, pp. 94–114). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.07.001>
- Paz Castillo, M. del P. (2000). *Ensayo agroeconómico para el establecimiento de Rosa multiflora Thund. in vitro* [Tesis de licenciatura]. Escuela Agrícola Panamericana.
- Roberts, A. V., & Schum, A. (2003). Cell, tissue and organ culture. In *Encyclopedia of rose science* (pp. 57–92).

Shaafi, B., Kahrizi, D., Zebarjadi, A., & Azadi, P. (2022). The Effects of Nanosilver on Bacterial Contamination and Increase Durability Cultivars of *Rosa hybrida* L. Through of Stenting Method. *Cellular and Molecular Biology*, 68(3), 179–188. <https://doi.org/10.14715/cmb/2022.68.3.21>

Villa Ramírez, R., & Arbeláez, L. M. (2019). Micropropagación in vitro de *Rosa rosa* sp. a partir de yemas axilares y respuesta callogénica. *Revista de La Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 31, 10–17.