



Universidad Austral de Chile

Escuela de Agronomía

**Establecimiento, multiplicación y enraizamiento
in vitro de *Rosa canina* L.**

Memoria presentada como parte de
los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Agronomía.

Eduardo Sebastián Weldt Carmona

Valdivia - Chile

2008

Profesor Patrocinante:

Peter Seemann F.
Ing. Agr., Dr. Rer. Hort.
Instituto de producción y sanidad vegetal

Profesores Informantes:

Nancy Andrade S.
Ing. Agr., M. Sc.
Instituto de producción y sanidad vegetal

Magaly Rivero G.
Prof. de Biología y Química, Dr. en Ciencias
Instituto de producción y sanidad vegetal

ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
	RESUMEN	1
	SUMMARY	3
1	INTRODUCCIÓN	5
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	7
2.1	Aspectos generales de la familia Rosaceae	7
2.1.1	Característica de rosa mosqueta	8
2.1.2	Ubicación en Chile de rosa mosqueta	9
2.1.3	Mercado de rosa mosqueta	9
2.1.4	Usos del cinorrodon	13
2.1.5	Diferencias entre especies de rosa mosqueta	13
2.2	Métodos de propagación de <i>R. canina</i>	15
2.2.1	Macropropagación	16
2.2.1.1	Acodos	16
2.2.1.2	Injertos de yemas	16
2.2.1.3	Estacas	16
2.2.2	Micropropagación	18
2.2.2.1	Ventajas y desventajas de la micropropagación	19
2.2.2.2	Fases de la micropropagación	20
2.2.2.2.1	Esterilización	21
2.2.2.2.2	Explantes	22
2.2.2.2.3	Medios de cultivo	25
2.2.2.2.3.1	Macro y micronutrientes	25
2.2.2.2.3.2	Vitaminas y aminoácidos	26
2.2.2.2.3.3	Reguladores de crecimiento	26

Capítulo		Página
2.2.2.2.3.3.1	Auxinas	27
2.2.2.2.3.3.2	Citoquininas	27
2.2.2.2.3.3.3	Giberilinas	28
2.2.2.2.3.4	Carbohidratos	28
2.2.2.2.3.5	Agentes gelificantes	29
2.2.2.2.3.6	pH del medio de cultivo	29
2.2.2.3	Preparación del medio de cultivo	30
2.2.2.4	Problemas en micropropagación	30
2.2.2.4.1	Pardeamiento	31
2.2.2.4.2	Vitrificación	31
3	MATERIAL Y METODO	33
3.1	Material	33
3.1.1	Ubicación de los ensayos	33
3.1.2	Material vegetal	33
3.1.3	Medios de cultivo	34
3.1.4	Material de laboratorio	34
3.2	Método	35
3.2.1	Obtención del material vegetal	35
3.2.2	Siembra de yemas	35
3.2.3	Condiciones ambientales	36
3.2.4	Descripción de los ensayos	36
3.2.4.1	Establecimiento de <i>R. canina</i>	36
3.2.4.1.1	Medio de cultivo	36
3.2.4.1.2	Tipo de tejido	37
3.2.4.1.3	Época del año	37
3.2.4.2	Multiplicación de <i>R. canina</i>	38
3.2.4.3	Enraizamiento de <i>R. canina</i>	38
3.2.5	Variables evaluadas	39
3.2.6	Análisis de resultados	39
3.2.6.1	Porcentaje de sobrevivencia	39

Capítulo		Página
3.2.6.2	Número de brotes	40
3.2.6.3	Porcentaje de enraizamiento y número de raíces	41
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	42
4.1	Ensayo de establecimiento de <i>Rosa canina</i> L.	42
4.1.1	Ensayo de tipo de tejido	42
4.1.2	Época del año	45
4.1.3	Medio de cultivo	49
4.2	Ensayo de multiplicación de <i>R. canina</i>	51
4.3	Ensayo de enraizamiento	53
5	CONCLUSIONES	56
6	BIBLIOGRAFIA	57
7	ANEXOS	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Características de las especies de rosa mosqueta presentes en Chile.	14
2	Tabla de contingencia sobre porcentaje de sobrevivencia según tipo de tejido.	42
3	Prueba de comparación múltiple de Tukey para evaluar sobrevivencia según tipo tejido.	43
4	Porcentaje de sobrevivencia según medio de cultivo.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Destinos de Exportación de rosa mosqueta chilena.	10
2	Precios vs volúmenes exportados de rosa mosqueta chilena.	11
3	Porcentaje de sobrevivencia según dosis hormonal (auxina/citoquinina) y época del año.	45
4	Porcentaje de sobrevivencia según medio de cultivo y época del año para el testigo.	47
5	Porcentaje de sobrevivencia según medio de cultivo y época del año para la concentración hormonal 0,1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP en el medio.	48
6	Porcentaje de sobrevivencia según medio de cultivo y época del año para la concentración hormonal 0,1 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP en el medio.	49
7	Porcentaje de sobrevivencia promedio según medio de cultivo y concentración hormonal en mg/L de ANA/BAP.	50
8	Promedio de número de brotes según distinta citoquinina y concentración hormonal.	51
9	Porcentaje de enraizamiento promedio según concentración de macroelementos y dosis de auxina en el medio.	53
10	Número promedio de raíces según dosis de auxina (ANA) y porcentaje de macroelementos en el medio.	55

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía		Página
1	Yemas axilares (izquierda) y planta madre de <i>R. canina</i> propagada (derecha).	34
2	Cultivos sobrevivientes de <i>R. canina</i>	40
3	Brotos de <i>R. canina</i>	40
4	Plántulas de <i>R. canina</i> enraizadas.	41

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1.1	Análisis de sobrevivencia según tipo de tejido	63
1.2	Análisis de sobrevivencia según concentración hormonal (ANA/BAP)	64
2	Análisis de sobrevivencia en ensayo época de extracción de material parental	65
2.1	Auxina/Citoquinina = Testigo	66
2.2	Auxina/Citoquinina = 0,1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP	67
2.3	Auxina/Citoquinina = 0,1 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP	68
3	Análisis de sobrevivencia en ensayo medio de cultivo	69
4	Análisis de número de brotes en ensayo de multiplicación	70
4.1	Análisis de número de brotes para BAP en ensayo de multiplicación	71
4.2	Análisis de número de brotes para 2IP en ensayo de multiplicación	72
4.3	Análisis de número de brotes incluyendo el tratamiento testigo en ensayo de multiplicación	73
5.1	Análisis presencia de raíces en ensayo enraizamiento	74
5.2	Análisis de número de raíces en ensayo enraizamiento	75
6	Tabla resumen de ensayos	77

RESUMEN

La especie *Rosa canina* L. se multiplica con fines comerciales usando propagación vegetativa por medio de esquejes, con bajos porcentajes de enraizamiento y altos costos por planta enraizada lista para trasplante. Debido a esta razón, es que la presente investigación está orientada a desarrollar un protocolo que permita la multiplicación *in vitro* en forma masiva. Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, perteneciente al Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Austral de Chile, en Valdivia, XIV Región de Los Ríos. Para el propósito de esta investigación se diseñaron distintos ensayos, para evaluar mensualmente la respuesta de *R. canina* frente a medios de cultivo *in vitro* elaborados para el establecimiento, multiplicación y enraizamiento de la planta. Se utilizó como material vegetal de propagación inicial yemas axilares de *R. canina*, las cuales fueron extraídas de una planta previamente seleccionada. Esta planta fue colectada a partir de material clonal, procedente del ecotipo P-518 de *R. canina* seleccionado en Puelche S. A. Para la fase de establecimiento se diseñaron 3 ensayos. El primero consistió en evaluar el medio de cultivo MS o WPM en que fueron sembradas las yemas de *R. canina*, además de evaluar distintas concentraciones hormonales de ANA y BAP. El segundo ensayo que consistió en evaluar el lugar de la planta de que provenga el material a propagar (ápice, medio y base), y el tercero, consistió en evaluar la respuesta de las yemas frente a la época del año (Enero y Marzo) en que fue extraído el material. Estos ensayos se evaluaron en un diseño completamente al azar y ordenados en un experimento factorial, teniendo como parámetro de evaluación el porcentaje de sobrevivencia. Para la fase de multiplicación, el ensayo se estableció en un diseño completamente al azar, con 6 tratamientos mas uno que fue el testigo, con 30

repeticiones cada uno, ordenados en un experimento factorial, teniendo como parámetro de evaluación el porcentaje de sobrevivencia y número de brotes. En cuanto a la fase de enraizamiento, el ensayo se estableció en un diseño completamente al azar, con 8 tratamientos, con 25 repeticiones cada uno, ordenados en un experimento factorial, teniendo como parámetro de evaluación el porcentaje de sobrevivencia, porcentaje de enraizamiento y número de raíces. Finalmente, se pudo demostrar en esta investigación que, se acepta la hipótesis de que el cultivo *in vitro* es una alternativa viable para una propagación masiva de *Rosa canina* L., ya que, para la fase del establecimiento se obtuvo un 100% de sobrevivencia con explantes extraídos en Marzo de cada año, de la parte media y superior de las ramas del año y usando un medio de cultivo MS con una concentración de 0,1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP. En cuanto a la fase de multiplicación, se pudo obtener en promedio 3,8 brotes por explante, usando un medio de cultivo MS con una concentración hormonal de 0,1 mg/L de ANA y 2,5 mg/L de BAP. Para la fase de enraizamiento, se logra un 92% de enraizamiento, con 4,2 raíces por explante usando un medio de cultivo con una concentración diluida al 50% de los macroelementos y con 0,1 mg/L de ANA.

SUMMARY

Rosa canina L. is commercially propagated by cuttings, with low rates of rooting and high costs of rooted plants ready for transplantation. Because of this reason, the present research is oriented to develop a protocol allowing the fast proliferation through *in vitro* culture. This work was carried out in the Tissue Culture Laboratory of the Institute of Plant Production and Health, Faculty of Agricultural Sciences, Universidad Austral de Chile, in Valdivia, XIVth Region, Chile. For the purpose of this investigation, different experiments were designed to evaluate the monthly response of *R. canina* compared to *in vitro* culture media developed for the establishment, multiplication and rooting of the plant. As plant material spreading initial axillary buds of the *R. canina* was used, which were taken from a previously selected plant. This plant was collected from clonal material, ecotype P-518 *R. canina* selected by Puelche S. A. in Los Angeles, Chile. For the establishment phase 3 experiments were designed. The first was to evaluate the MS or WPM growing media supplemented with different hormone concentrations of NAA and BAP. The second test was to evaluate the origin of the buds (apex, middle and base), and the third was to assess the response the season (January and March) in which the buds were extracted. These tests were arranged in a completely randomized design as evaluating the factorial experiments and the percentage of survival. For the multiplication phase, the test was established in a completely randomized design, with 6 treatments plus a control, with 30 replications, arranged as a factorial experiment, and evaluating the number and percentage of survival outbreaks. For the rooting phase, the experiment was established in a completely randomized design, with 8 treatments, and 25 replications, arranged in an factorial experiment, and evaluating the percentage of survival and the number and percentage of rooting. Finally, the hypothesis that the *in vitro* cultivation is a viable

alternative for a massive spread of *Rosa canina* L., could be accepted. For the establishment phase a 100% survival rate with explants taken in March, from the middle and upper branches of the year and using a MS culture medium with 0.1 mg/L of NAA and 1 mg/L of BAP could be reached. For the multiplication phase, an average of 3.8 shoots per explant could be obtained, using a MS medium with 0.1 mg/L of NAA and 2.5 mg/L of BAP. For the rooting phase, 92% rooting was achieved, with 4.2 roots per explant, using a half strength MS with 0.1 mg/L of NAA.

1 INTRODUCCION

La multiplicación de las plantas para la industria ha sido en general una de las aplicaciones prácticas del cultivo *in vitro*, ya que permite la multiplicación de un genotipo específico sin que se presente segregación de caracteres genéticos, asegurando así una homogeneidad en la producción. Durante los últimos 20 a 25 años, muchos laboratorios han sido adecuados y transformados para este propósito en diversos países del mundo, pero particularmente en USA, Europa y sur de Asia.

Aunque los precios de la propagación *in vitro* se han reducido algo con las nuevas técnicas desarrolladas, estos son en sí elevados, debido a los métodos y cuidados especiales que es necesario utilizar para obtener buenos resultados en los microcultivos. Esto significa que, actualmente, solo plantas con un alto valor comercial pueden ser propagadas competitivamente por este método.

Debido a lo anterior, la propagación *in vitro* en alguna de las especies de la familia *Rosaceae* es una técnica ampliamente desarrollada. Esto se debe a la gran importancia que posee esta familia para la industria nacional e internacional, ya que la conforman un amplio número de plantas arbóreas frutales, tales como manzanos, perales, durazneros, ciruelos, almendros, entre otros, y arbustivas, tal como rosa mosqueta.

La rosa mosqueta en particular presenta un precio elevado para la industria mundial, ya que, debido al alto contenido de vitamina C en el fruto, esta planta es muy utilizada en la industria de la infusión, así como también en la industria farmacéutica y gastronómica. Además, del fruto se puede obtener gran variedad de productos, tales como aceites, colorantes y saborizantes, entre otros.

En la práctica, la propagación *in vitro* de la rosa mosqueta (*Rosa canina* L.) no se ha llevado a cabo en forma masiva, ya que la mayoría de los estudios realizados se han hecho mediante la propagación de esquejes o estacas, obteniendo como resultado una sobrevivencia fluctuante del 20 al 60%, como máximo.

Por lo tanto, se plantea como hipótesis de que el cultivo *in vitro* es una alternativa viable para la propagación masiva de *Rosa canina* L.

Debido a ello, el objetivo general de esta investigación es desarrollar un protocolo que permita la micropropagación de la *Rosa canina* L.

Los objetivos específicos son:

- Seleccionar un medio de cultivo adecuado para el establecimiento del explante.
- Encontrar un medio de cultivo adecuado para la multiplicación del explante.
- Diseñar un medio de cultivo adecuado para el enraizamiento del explante.
- Evaluar la respuesta del explante según las épocas de recolección del material.
- Evaluar el lugar de la planta de que provengan las yemas para la micropropagación.

2 REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Aspectos generales de la familia Rosaceae

SUDZUKI (1992), indica que las Rosáceas constituyen una familia de gran importancia debido a su gran número de plantas leñosas, herbáceas y arbustivas que la integran, además es muy importante por sus árboles y arbustos frutales, así como también, por las numerosas especies de valor ornamental.

Según BALDINI (1992), esta familia presenta hojas caducas o perennes, en su mayoría alternas, simples o compuestas, y generalmente con glándulas, además posee estípulas, generalmente pareadas y a veces soldadas al pecíolo.

En cuanto a las características florales de esta familia, normalmente son hermafroditas y con frecuencia de un tamaño medio a grande. Por lo general son pentámeras, aunque en la jardinería aparecen flores con un mayor número de pétalos. Estas flores están compuestas por numerosos estambres dispuestos en diversos verticilos, normalmente múltiplos de 5. Posee uno a varios carpelos libres o unidos al tubo del cáliz (FINOT *et al.*, 1996).

Según BALDINI (1992), presenta variados frutos súperos o ínferos tales como aquenios, folículos, bayas, pomos, drupas, etc., con variable número de semillas.

La familia *Rosaceae* comprende alrededor de 100 géneros y más de 3.000 especies ampliamente distribuidas por el mundo, con mayor presencia en las regiones templadas y subtropicales del hemisferio norte (ESPINOSA, 1996).

Los árboles y arbustos frutales de mayor importancia económica que pertenecen a esta familia son el manzano, peral, duraznero, cerezo, ciruelo, almendro y otros. Además se encuentra el género *Rosa*, con diversas especies, de las cuales se conocen más de 5.000 cultivares (ESPINOSA, 1996).

2.1.1 Característica de rosa mosqueta. Es originaria de Europa central, Polonia, Hungría y Rusia. En Chile, la presencia silvestre del género *Rosa* para la zona central del país, fue citada por primera vez por Claudio Gay en su “Flora de Chile II” en el año 1847.

REICHE (1897), en sus “Estudios Críticos sobre la Flora de Chile” editados en los “Anales de la Universidad de Chile” el año 1897 cita a esta especie, que crece en forma silvestre, como *Rosa canina* L., lo que sugiere la introducción al país con la Colonización Española a partir del siglo XVI – XVII. Es seguro que con posterioridad varios contingentes de este género llegaron desde Europa.

MATTHEI (1995), indica que la rosa mosqueta es una especie abundante que crece en terrenos abandonados o entremezclada con la flora nativa. Solo ocasionalmente se presenta como maleza, pero es de fácil eliminación.

La rosa mosqueta en Chile ha sido clasificada como un frutal menor. Es un arbusto perenne con tallos leñosos de hasta 2 metros de alto, erectos y poco ramificados. Posee una raíz pivotante de 1 a 1,5 metros de profundidad, con una masa radical superficial que puede emitir retoños o hijuelos que pueden fructificar a partir del segundo año (SUDZUKI, 1992).

Presenta numerosas espinas de 4 mm. hasta 1 cm. de largo y curvas. Las hojas son pinnatisectas de 2 a 5 cm. de largo con 5 a 7 folíolos de 10 a 18 mm. de largo, la base es redonda con un margen aserrado, glabros o pubescentes en el haz y pubescente - glandulosos en el envés. Presenta flores solitarias o agrupadas de 2 o 3, sobre pedúnculos de 8 – 15 mm. de largo. Posee numerosos estambres y estilos cortos (ESPINOSA, 1996 y MATTHEI, 1995).

La floración ocurre entre octubre y diciembre, produciendo un hipanto ovoide rojo anaranjado llamado "cinorrodon". Su interior es pubescente, al igual que los numerosos aquenios que posee. Vulgarmente al cinorrodon se le llama fruto, mientras que a los aquenios se conocen como "pepas" (SUDZUKI, 1995).

2.1.2 Ubicación en Chile de rosa mosqueta. Actualmente cubre en forma natural una vasta región del país, 15.000 hectáreas aproximadamente, desde la provincia de Santiago hasta la provincia de Aisén, especialmente en suelos de secano y de baja calidad agrícola. Se describe la presencia de tres especies: *Rosa eglantheria* o *Rosa rubiginosa* L. como la principal representante, *Rosa moschata* L. ubicada especialmente en la cuenca de Santiago (Cajón del Maipo) y *Rosa canina* L. distribuida en pequeños grupos a lo largo de Chile (SUDZUKI, 1995; JOUBLAN *et al.*, 2000).

En Chile la mayor densidad de población se encuentra en las regiones VII, VIII y IX, desde Parral a Temuco, entre la cordillera de la Costa y Los Andes, alcanzando su máxima superficie en la región del Bío-Bío con 9.000 hectáreas, con una producción promedio de frutos de 400 kg/ha (JOUBLAN y BERTI, 1997).

2.1.3 Mercado de rosa mosqueta. Esta planta produce frutos que son de gran valor comercial, debido a su alto contenido de ácido ascórbico, el cual varía entre 500 a 1400 mg en 100 gramos de producto fresco, en comparación con el limón que presenta 40 a 70 mg en 100 gramos de producto, y a sus excelentes características organolépticas (ROUHANI *et al.*, 1976 y STRITZKE, 1962).

Según STRITZKE (1962), existen muy pocos frutos tan ricos en vitamina C, tanto es así, que la rosa mosqueta debe de clasificarse dentro de las plantas medicinales y no como un arbusto frutal.

En Chile su uso industrial data de 1966, pero desde el año 1974 existen registros de producción y exportación de rosa mosqueta. El mayor importador de mosqueta chilena es Alemania con un 68%, lo sigue Suecia, Estados Unidos, Rusia, Japón, Croacia y Eslovenia, como se muestra en la FIGURA 1 (MACROSCOPECHILE, 2008 y SUDZUKI, 1992).

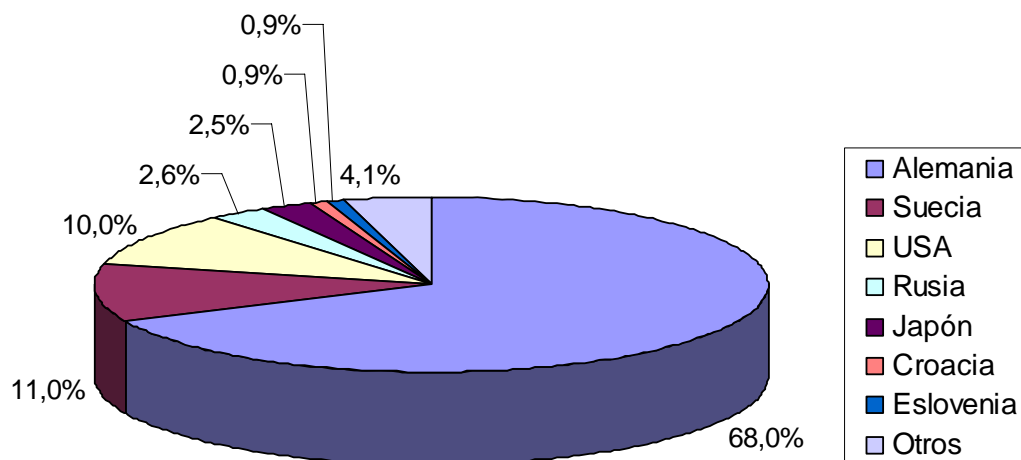


FIGURA 1 Destinos de Exportación de rosa mosqueta chilena.

FUENTE: MACROSCOPECHILE (2008).

La exportación de rosa mosqueta ha adquirido un gran dinamismo en la última década, lo que se ve reflejado en un aumento de los volúmenes exportados, pasando de 150 tons. de cascarilla deshidratada en el año 1974 a 5400 tons. en el año 2007. Actualmente se comercializa la cascarilla, el concho y las semillas (materia prima en la obtención de aceite), para diferentes usos como farmacéutico, colorante y gastronómico, entre otros (JOUBLAN *et al.*, 2000).

Según Eduardo Weldt Suazo¹, el principal producto de exportación de la rosa mosqueta es la cascarilla deshidratada en sus diferentes presentaciones; cascarilla propiamente tal y diferentes cortes dimensionados tanto en color como en tamaño, para usos principalmente en la industria del Té.

Chile tiene gran importancia como proveedor mundial de rosa mosqueta, con una presencia por sobre el 70% de la oferta mundial y mantenida por más de 30 años. La calidad de la fruta nacional, junto al conocimiento en el procesamiento de la fruta, de cosecha casi en un 100% a partir de plantas silvestres, ubican al país como el más importante proveedor mundial de este producto¹.

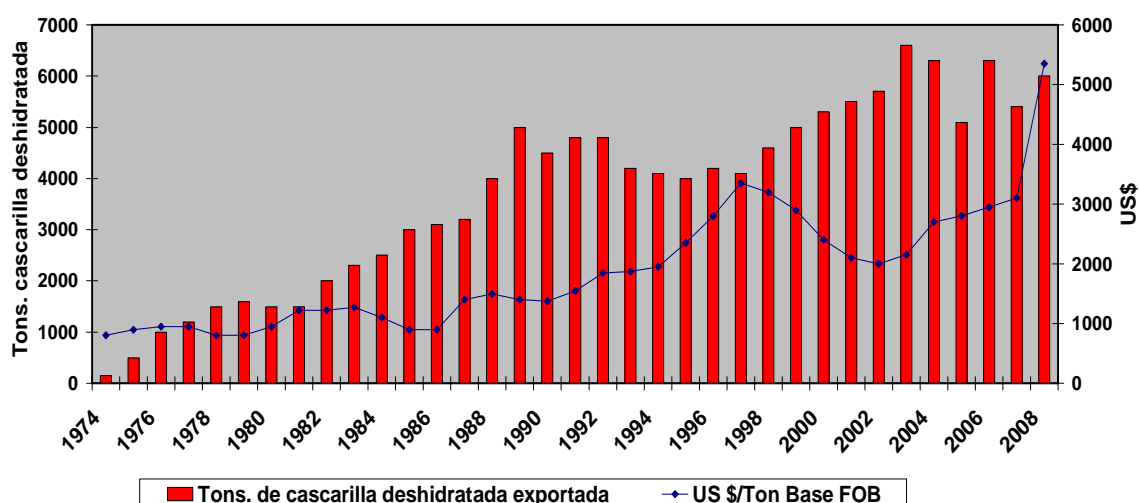


FIGURA 2 Precios vs volúmenes exportados de rosa mosqueta chilena.

FUENTE: MACROSCOPECHILE (2008).

¹ Entrevista personal con el Sr. Eduardo Weldt Suazo, Biólogo y responsable del programa Cultivo de *Rosa canina* L., en Puelche S. A.

Si se observa la FIGURA 2, correspondiente al gráfico de precios y volúmenes de exportación de la rosa mosqueta, principalmente durante el último período de 10 años, se puede concluir que a pesar de los aumentos en los precios de exportación, pasando de US\$ 2000 la tonelada durante el 2002 a US\$ 5350 la tonelada para el presente año 2008, este aumento de precios no se ve reflejado en un aumento equivalente en los volúmenes exportados para el mismo período, que van de 5700 tons. en el año 2002 a 6000 tons. aproximadamente para el año 2008¹.

Se puede concluir, si se observa la variación de precios versus los volúmenes exportados, que hay una demanda insatisfecha, no obstante el aumento en los costos de producción incorporado en los precios. Esto es atribuible a que no existen nuevos lugares silvestres de extracción del cinorrodon por vía de la cosecha manual¹.

Un simple análisis de esta situación indica la necesidad de desarrollar cultivos de rosa mosqueta para una cosecha mecanizada a objeto de aumentar la oferta exportable e incentivar el consumo mundial a precios más estables y menos sujetos a las condiciones internas variables del país, referidas a la disponibilidad de mano de obra para la cosecha, en competencia con otras actividades agrícolas¹.

Actualmente el abastecimiento de fruta a partir de cultivos no alcanza el 5% del volumen anual de 30.000 tons. de fruta fresca que actualmente demanda el mercado¹.

Es una imperiosa necesidad el desarrollo de nuevos cultivos, con técnicas adecuadas de multiplicación de la rosa mosqueta, para la obtención de plantaciones homogéneas que permitan llegar a un óptimo de producción y rentabilidad, para así poder suplir la demanda mundial de este producto natural¹.

¹ Entrevista personal con el Sr. Eduardo Weldt Suazo, Biólogo y responsable del programa Cultivo de *Rosa canina* L., en Puelche S. A.

2.1.4 Usos del cinorrodon. Los frutos recolectados para la exportación provienen de las especies *Rosa rubiginosa*, *Rosa moschata* y en menor grado de *Rosa canina* L., exhibiendo morfologías globosa a ovada, color del rojo al anaranjado y pesos máximos de 1,5 a 3 gramos según la especie (JOUBLAN y BERTI, 1997).

ISRAEL Y BENADO (1977), señalan como productos del cinorrodon o fruto de la rosa mosqueta a la cascarilla (receptáculo maduro, deshidratado, desmenuzado y sin semillas), el concho (subproducto de la deshidratación del fruto, cascarilla muy molida, con restos de semillas y pistilos secos), pelos (pistilos secos), semillas (aquenios) y el aceite.

Por su alto contenido de vitamina C, y en menor grado, vitamina A, B1, B2, E y K, además de sus condiciones diuréticas, la rosa mosqueta es ampliamente utilizada en la industria de la infusión, así como también, en la industria farmacéutica. Por otro lado, el aceite proveniente de los aquenios es rico en ácidos grasos insaturados y ácido transretinoico, que en uso tópico permiten la regeneración de tejidos y evita el envejecimiento celular prematuro (HOFFMANN *et al.*, 1992 y STRITZKE, 1962).

Según EBERT (1979), el aquenio o el corte fino de rosa mosqueta, puede ser utilizado para la alimentación de aves ponedoras, ya que sería una fuente pigmentante de la yema y cáscara de huevos.

2.1.5 Diferencias entre especies de rosa mosqueta. Las principales características y diferencias de las especies de rosa mosqueta presentes en Chile se presentan en el CUADRO 1 (JOUBLAN *et al.*, 2000).

CUADRO 1: Características de las especies de rosa mosqueta presentes en Chile.

Característica	<i>Rosa rubiginosa</i>	<i>Rosa moschata</i>	<i>Rosa canina</i>
Distribución	Cauquenes al sur.	Los Sauces	Los Sauces
Altura	0,5 - 1,2 m	1 - 2 m, a veces hasta 2,5 m.	1,9 - 3,5 m
Hojas	5 - 7 doblemente aserradas	5 - 9 finamente aserradas	3 - 7 doblemente aserradas
Longitud de las hojas	1,5 - 2 cm.	2 - 6 cm.	2 - 4 cm.
Flores	Rosadas, solitarias o agrupadas de 2 – 3	Blancas, en corimbos de 10 - 15 flores	Blancas, solitarias o agrupadas de 1 – 5
Fruto	Subgloboso u ovoide	Ovado	Ovalado glabro
Color fruto	Rojo - anaranjado (1,0 - 1,5 g)	Rojo (hasta 2,5 g)	Rojo (hasta 3 g)
Floración	Octubre a diciembre	Octubre a diciembre	Octubre a diciembre
Estilos	Libres	Unidos en una columna	Libres
Foliolos	Pubescentes-glandulosos	Glandulosos	Glabros o subglabros
Glándulas	Presentes	Presentes	Sin o ralmente glandulosos
Pedúnculos	Espinescente-glandulosos	Espinescente-glandulosos	Glabros

FUENTE: JOUBLAN *et al.* (2000).

Según JOUBLAN *et al.* (2000), la especie de rosa mosqueta que presenta mejores características para ser propagada es *R. canina*. Esto se debe a que presenta condiciones muy deseables para la industria.

Estas condiciones son:

- Producir el fruto más grande de las tres especies (hasta 3 gramos) con un color rojo intenso.
- No poseer glándulas.
- Poseer pedúnculos glabros, al contrario de las otras dos especies que poseen pedúnculos espinescentes.

2.2 Métodos de propagación de *R. canina*.

El cultivo de la rosa mosqueta es una alternativa válida para materializar la reconversión agrícola de algunas zonas, gracias a su buena adaptación a condiciones de secano. Sin embargo, no se ha podido sustentar como tal, debido a que no existe un cultivo planificado. Una de las causas principales de esto, es la falta de un método fácil de multiplicación de la especie y la obtención de una población homogénea, que permita llegar a un óptimo de producción y rentabilidad (ACEVEDO, 1997).

El método de propagación más antiguo que existe es mediante semillas. Este método no es muy utilizado a nivel industrial, ya que se obtiene gran variabilidad genética, en otras palabras, obtención de nuevos genotipos (INFOAGRO, 2003).

Según FUCHS (1950), la semilla interviene como medio de multiplicación del rosal en dos casos:

- a) Cuando se hacen germinar las semillas de las plantas híbridadas para la obtención de variedades nuevas.
- b) Cuando se trata de obtener gran cantidad de plantas jóvenes de rosal silvestre que han de servir de pie para los injertos de las variedades en explotación.

La propagación industrializada de la rosa se puede llevar a cabo por diferentes métodos, los más utilizados son mediante acodos, injertos de yemas (empleado a nivel comercial floral), estacas y micropropagación (INFOAGRO, 2003).

2.2.1 Macropropagación. La macropropagación es un sistema de propagación de bajo costo, ya que el material generalmente se saca a partir de ramas obtenidas por poda. Esto hace que se obtenga una gran cantidad de nuevas plantas, que guardan las mismas características y calidad que la planta madre (SABJA, 1980).

2.2.1.1 Acodos. Este método de propagación vegetativa provoca la formación de raíces adventicias en un tallo que está todavía adherido a la planta madre, el cual posteriormente es separado, convirtiéndose en una nueva planta que crecerá con sus propias raíces (HARTMANN *et al.*, 2002).

Al igual que por semilla, es un sistema que se usa muy poco. Aunque sigue siendo muy útil para la multiplicación de algunos tipos de rosales sarmentosos (FUCHS, 1950).

2.2.1.2 Injertos de yemas. Según FUCHS (1950), multiplicar un rosal por injerto consiste sencillamente en tomar una yema de una variedad e injertarla sobre un rosal silvestre que actúa como patrón o portainjerto. Los sistemas comúnmente utilizados son de escudete y el injerto sobre la raíz. Los patrones más usados son *Rosa canina* L., *Rosa eglanteria* L. o el híbrido 'Manetti'. De esta yema que se injertó saldrá un brote que dará lugar a la copa (ramas, hojas y flores). Esta es la forma que utilizan los viveros comerciales de rosales ornamentales.

2.2.1.3 Estacas. En la propagación por estacas, se corta de la planta madre una porción de tallo o rama, después de lo cual, esa porción se coloca en condiciones ambientales favorables y se induce a que forme raíces y tallos, obteniéndose con ello, una planta nueva e independiente. En aquellas especies, que se pueden propagar con facilidad por estacas, este método tiene numerosas ventajas, como son, el que a partir de unas cuantas plantas madres, sea posible iniciar muchas nuevas plantas, en un

espacio limitado; es económico, rápido y simple ya que no requiere técnicas especiales y finalmente, la planta madre, por lo general, se reproduce exactamente sin cambio genético en la descendencia (SABJA, 1980).

BALDINI (1992), señala que la estaca es una porción separada de la planta, provista de yemas caulinares e inducida a emitir raíces. Se utiliza para la propagación tanto estacas leñosas, como también estacas herbáceas o semileñosas (porciones de brotes menos lignificados) y también estacas de raíz; siendo las dos primeras estacas provistas de hojas.

Las estacas herbáceas o semileñosas, por lo general, enraízan con mayor facilidad y rapidez que la de madera leñosa, pero requieren más atención y equipo. A las estacas de este tipo siempre se les dejan algunas hojas. Por lo tanto, se les debe manejar con cuidado, para impedir que se sequen y deben hacerse enraizar en condiciones que impidan pérdidas excesivas de agua por las hojas. En la mayoría de las especies, durante el enraizamiento se debe mantener en la base de las estacas una temperatura de 23 a 27°C; y de 21°C en las hojas. En la mayoría de los casos, las estacas de madera semileñosa y herbácea producen raíces en un lapso de 2 a 5 semanas. En general, responden bien al tratamiento con sustancias que estimulan el enraizamiento, como es el caso de los reguladores de crecimiento. (HARTMANN *et al.*, 2002).

El objetivo de tratar estacas con sustancias reguladoras del crecimiento del tipo auxinas, es aumentar el porcentaje de estacas que forman raíces, acelerar la iniciación de ellas, aumentar el número y calidad de las raíces producidas por estaca y aumentar la uniformidad del enraizamiento. Es posible que en las plantas que enraízan con facilidad, no se justifiquen los gastos y esfuerzos adicionales del tratamiento. El mejor uso de las hormonas de enraizamiento, es en estacas que enraízan con dificultad, aunque se debe aclarar que los tratamientos con estas sustancias pueden, como máximo, aumentar una latente potencialidad rizógena, pero no crearla. Sin embargo, el empleo de estas sustancias no permite que se ignoren otras buenas prácticas de la propagación por estacas, tales como el mantenimiento de éstas en condiciones apropiadas de agua, temperatura y luz (HARTMANN *et al.*, 2002).

El mismo autor dice que las concentraciones relativamente bajas de auxinas estimulan el crecimiento, en cambio las concentraciones altas lo inhiben, aunque la concentración óptima dependa de la especie y del tipo de tejido.

El sistema de propagación más utilizado en Chile y en el mundo para la *R. canina* es mediante este método. Estas estacas se cortan de un largo de 15 cm. y son plantadas en un sustrato de arena. El porcentaje de enraizamiento de *Rosa canina* L. en estudios hechos en Chile es del orden de 10 al 20%. En cambio, en estudios hechos en Turquía se han obtenido resultados cercanos al 30%. Este mayor porcentaje de enraizamiento se debe al remojo de las estacas con 25 ppm de ácido indol butírico por 20 minutos (HOSAFICI *et al.*, 2005).

2.2.2 Micropropagación. Una alternativa a la macropropagación es aplicar la técnica de micropropagación que consiste en tomar células o tejidos de la planta, preferiblemente de origen meristemático, que se encuentran en las yemas. Lo que se hace en el laboratorio es programar esas células para que formen tallos. Luego, se multiplican esos tallos y se aplica un programa de enraizado, es decir, se cambian las condiciones hormonales para que forme raíz. Una vez que la planta está completa y que puede absorber nutrientes por raíz, se lleva a un invernadero (MEDINA, 2005).

La micropropagación se relaciona con la multiplicación de un genotipo específico sin que se presente segregación de caracteres genéticos. A menudo incluso se le relaciona con la propagación de determinadas plantas a un precio competitivo, como técnica de intensificación de la producción de material vegetal (SEEMANN, 1993).

Según HARTMANN *et al.* (2002), debido a que la técnica de cultivo de tejidos *in vitro* se desarrolla dentro de un frasco de vidrio o plástico transparente, bajo condiciones de control ambiental y utilizando un medio formulado para el buen desarrollo de los explantes, es que se denomina *in vitro*.

Según SEEMANN (1993), el cultivo de tejidos *in vitro* tiene una amplia gama de aplicaciones, de acuerdo al objetivo que se desee lograr, e implica, en forma más amplia, la utilización de células, tejidos u órganos, genéticamente denominados explantes, de las más diversas procedencias dentro de la planta.

Las técnicas de cultivos asépticos han contribuido no sólo a un mejor entendimiento de los eventos de la diferenciación celular, sino a un mejor aprovechamiento de tales eventos en la explotación más eficiente de las plantas. Estos es la obtención de plantas libres de virus y otros patógenos, mejoramiento genético, introducción de especies y variedades, conservación de germoplasma y propagación masiva de especies (SEEMANN, 1993).

Por lo tanto, la micropropagación permite la reproducción de miles de plantas por metro cuadrado y tiene la ventaja de que si el ejemplar parental es sano, todas las plantas que se originen a partir de él, son sanas. Además, permite obtener descendencia genéticamente similar. Esto asegura la homogeneidad de la producción (MEDINA, 2005).

En la actualidad la micropropagación se está aplicando con gran éxito en una gran gama de cultivos hortícolas, ornamentales, frutales y forestales, sin dejar de lado la aplicación de estas técnicas en cultivos extensivos de los que se ha seleccionado genotipos superiores de los cuales es necesario contar con gran número de plantas idénticas (SEEMANN, 1993).

2.2.2.1 Ventajas y desventajas de la micropropagación. De acuerdo con GEORGE y SHERRINGTON (1984) y SEEMANN (1993), la micropropagación es una técnica que ha mostrado importantes ventajas en comparación con los métodos convencionales de propagación en algunas especies.

Estas ventajas se pueden resumir como sigue:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente rentables.
- Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga.
- Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro con menos restricciones aduaneras.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan pocos individuos.

Sin embargo, según HARTMANN *et al.* (2002), la micropropagación a escala comercial posee características particulares que podrían crear problemas y por ende limitan su uso.

Estas desventajas se pueden resumir como sigue:

- Requerimiento de costoso y sofisticado material de trabajo, entrenamiento del personal y especialización técnica.
- Alto costo inicial de las labores.
- La contaminación puede causar altas pérdidas en corto tiempo.
- Se requiere un volumen alto, más o menos continuo en el sistema de distribución de materiales e insumos.

2.2.2.2 Fases de la micropropagación. El cultivo *in vitro* presenta cuatro etapas bien marcadas, estas son: Establecimiento del material en un medio aséptico, multiplicación del material vegetal, enraizamiento y ambientación de las plantas a las condiciones ambientales normales (GEORGE y SHERRINGTON, 1984; SEEMANN, 1993).

Según HARTMANN *et al.* (2002), para el establecimiento del material vegetal en un medio aséptico, se debe tener en cuenta tres distintos factores, estos son: esterilización, explantes y medios de cultivo.

2.2.2.2.1 Esterilización. Una porción de la planta recién aislada de ordinario está asociada a hongos, bacterias o ambos. En consecuencia, el requisito inicial en las preparaciones de micropropagación es eliminar esos microorganismos. Las condiciones en el medio de cultivo son tan favorables para los microorganismos, que la porción separada de la planta puede ser destruida con rapidez por cualquier organismo contaminador (HARTMANN *et al.*, 2002).

El material vegetal extraído de la planta madre debe ser lavado en agua corriente para eliminar restos de polvo y contaminantes mas gruesos. A continuación es conveniente usar agua destilada con unas gotas de un detergente o un producto tenso activo para romper la tensión superficial y permitir una mejor penetración de los productos esterilizantes. Las demás etapas de la esterilización se llevan a cabo bajo ambiente estéril en una cámara de flujo laminar. Se utiliza una solución de etanol al 70%, en la cual permanece el tejido por un tiempo corto, 5-30 segundos para tejidos herbáceos. A continuación se utiliza el esterilizante propiamente tal, cuya concentración y tiempo de tratamiento varían según el producto a usar y el explante a esterilizar. Algunos productos comúnmente usados son hipoclorito de calcio, hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno, agua de bromo, nitrato de plata, cloruro de mercurio y antibióticos. Finalmente, es necesario remover los esterilizantes de la superficie del tejido, para lo cual se procede a lavarlo 2 a 3 veces consecutivas con agua destilada estéril (SEEMANN, 1993).

PATI *et al.* (2005), utiliza, para la esterilización inicial de los explantes de rosa, etanol 70% por 20 a 30 segundos, seguido de una solución de 0,1% de HgCl₂ por 5 a 7 minutos y un lavado con agua destilada. Luego se usa una solución de hipoclorito de sodio al 5,25% de ingrediente activo y Triton X 0,1% por 5 a 10 minutos, seguido de un lavado con agua destilada. Además se puede preparar una solución para una

desinfección interna a base de diferentes antibióticos (tetraciclina, amoxicilina, gentamicina o ampicilina) a distinta concentración y duración.

2.2.2.2.2 Explantes. El éxito en el cultivo *in vitro* está en parte influenciado por factores inherentes al explante, incluido el tamaño, la edad fisiológica, la fuente del órgano o tejido y el genotipo (CONGER, 1981).

Tanto el estado fisiológico como sanitario de la planta que da el explante (planta donante) influyen significativamente en su capacidad morfogénica. Se ha encontrado, por ejemplo, que los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos provienen de plantas en diferentes edades fisiológicas (ROCA y MROGINSKI, 1991).

Asimismo, se ha observado que la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis. Se sabe que mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro* (ROCA y MROGINSKI, 1991).

La posición relativa de las yemas es otro factor importante, ya que se ha observado que las yemas axilares de las rosas obtenidas de la parte media del tallo, se desarrollan más rápidamente que aquellas obtenidas de la base (ROCA y MROGINSKI, 1991).

MEDEROS y ENRIQUEZ (1987), indican que el material extraído de maderas blandas, desde la parte media hacia arriba de la planta, presentan mayor respuesta en los cultivos *in vitro* que el material proveniente de maderas duras (material lignificado de la base).

El tamaño del explante es otro aspecto que se debe tener en cuenta para el establecimiento de un cultivo. Frecuentemente existe un tamaño óptimo para los explantes usados para iniciar un cultivo de tejidos. Explantes muy pequeños, ya sea bordes o meristemas, fragmentos enteros de tejidos de plantas o piezas de callos, no

sobreviven bien en cultivos, y por el contrario, el uso de explantes grandes puede traer consigo la dificultad de realizar una desinfección efectiva (GEORGE y SHERRINGTON, 1984).

Los factores físicos también juegan un rol determinante en el establecimiento de los explantes. La luz y la temperatura han sido factores ampliamente estudiados (ROCA y MROGINSKI, 1991).

La incubación de los explantes se hace en una sala *ad hoc* que debe ser de acceso restringido. El área de incubación debe proporcionar condiciones adecuadas en cuanto a temperatura, luz y humedad relativa (SEEMANN, 1993).

La intensidad lumínica por lo general fluctúa desde 1000 a 5000 Lux y va a depender de la cantidad y calidad de tubos fluorescentes instalados en la repisa (SEEMANN, 1993).

Según HORN (1992), la intensidad de la luz juega un rol muy importante en el crecimiento satisfactorio de los explantes, además nos indica que, la intensidad debe fluctuar entre 1000 y 3000 Lux para el éxito en los cultivos de rosas.

KHOSH-KHUI y SINK (1982), indican que si se aumenta la intensidad lumínica por sobre los 3000 Lux hace que disminuya el porcentaje de enraizamiento de los explantes de rosa.

En cuanto a la temperatura MARGARA (1988), señala que la micropropagación se puede llevar a cabo entre rangos de 22 a 25°C durante el período de luz y de 15 a 18°C en el período de oscuridad.

LEYHE y HORN (1994), indican que la temperatura ideal para la micropropagación de diferentes cultivares de rosas es 21°C.

Sin embargo, existen muchos estudios que indican que la temperatura óptima es alrededor de 25°C, para los explantes de rosas (HORN, 1992; CARELLI y ECHEVERRIGARAY, 2002), aunque RAHMAN *et al.* (1992), obtuvo excelentes resultados con temperaturas cercanas a los 28°C.

El fotoperíodo es otro aspecto importante, este debe ser regulado con exactitud, evitando influencias del fotoperíodo natural, por lo que la sala de incubación no debe poseer ventanas. Usualmente el fotoperíodo se regula a 12-16 horas (SEEMANN, 1993).

DAVIES (1980), indica que la respuesta de los microcultivos de rosa es superior con 16 horas luz que con 8 horas luz, además, esta luz debe ser fluorescente o blanca.

Según HARTMANN *et al.* (2002), la humedad relativa dentro del cuarto de incubación debería fluctuar entre 70-80%. Valores más bajos, a menudo producen una desecación del medio de cultivo.

En cuanto a la concentración de CO₂, WOLTERING (1990), indica que es un factor importante en la micropropagación, ya que si se aumenta la concentración a 5% y se baja la intensidad luminosa, se presenta un efecto positivo en el crecimiento de las plantas.

De acuerdo a GEORGE y SHERRINGTON (1984), la producción de plantas desde brotes ha probado ser el método más aplicado y más seguro para propagación *in vitro*. Este tipo de propagación *in vitro* presenta dos metodologías usadas, el cultivo de yemas apicales y axilares, y el cultivo de nudos individuales.

El cultivo de yemas apicales y axilares corresponde al método comúnmente usado para micropropagación comercial *in vitro*. El explante usado para comenzar los cultivos de este tipo son yemas apicales o laterales las cuales pueden medir más de 20 mm. de largo (GEORGE y SHERRINGTON, 1984).

El cultivo de nudos individuales es otra de las técnicas *in vitro* que puede ser usada para propagar plantas desde yemas axilares. Este modelo se utiliza en plantas con brotes que poseen una alta dominancia apical. Brotes largos son cortados con un nudo individual para posteriormente ser sembrados en forma vertical en el medio. Las yemas axilares de cada nudo elongan y crecen en longitud. Este modelo se repite por nuevos cortes en el segmento y su posterior subcultivo (HARTMANN *et al.*, 2002).

LI *et al.* (2002), indica que el mejor material para la micropropagación de rosa es el proveniente de los meristemas axilares de la planta. Además se encontró que el uso de ácido abscísico en una concentración de 3.8 a 7.6 $\mu\text{mol/L}$, es el que mejor promueve la proliferación e inducción de embriogénesis somática.

PATI *et al.* (2005), indica que para la propagación *in vitro* de rosa se pueden usar diferentes explantes, tanto meristemas axilares y apicales, brotes laterales y ápices. Específicamente para *R. canina* los mejores explantes provienen de los meristemas axilares y del material del ápice.

2.2.2.2.3 Medios de cultivo. El éxito del cultivo *in vitro* es altamente influenciado por la naturaleza del medio de cultivo usado. Para un crecimiento sano y vigoroso, las plántulas necesitan tomar del medio iones inorgánicos (macro y micronutrientes), carbohidratos (usualmente sacarosa), vitaminas, aminoácidos y fitohormonas (GEORGE Y SHERRINGTON, 1984).

2.2.2.2.3.1 Macro y micronutrientes. Los macroelementos indispensables en un medio de cultivo son nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio y magnesio, los cuales intervienen en la conservación de los equilibrios iónicos de las plantas (MARGARA, 1988).

Los microelementos son esenciales en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas. Los principales son: hierro, cobre, zinc, manganeso, molibdeno, boro y cloro (ROCA y MROGINSKI, 1991).

MARTIN *et al.* (1981), indica que aumentando las concentraciones de Ca, Mg, Fe y Mn en el medio, se puede observar una positiva respuesta en la calidad de los explantes.

2.2.2.2.3.2 Vitaminas y aminoácidos. Estas sustancias son efectivas en pequeñas cantidades y actúan como factores de la división celular o del crecimiento (MARGARA, 1988).

Los medios de cultivo generalmente contienen variadas vitaminas, tales como el ácido nicotínico, piridoxina, inositol, ácido pantoténico, biotina, pero la única, según SEEMANN (1993), que ha probado ser un componente esencial de varios medios de cultivo es la tiamina (Vit.B1).

Además de vitaminas, se incorporan aminoácidos a los medios de cultivo, siendo la glicina la que mas se utiliza (ROCA y MROGINSKI, 1991).

2.2.2.2.3.3 Reguladores de crecimiento. Generalmente es necesario agregar una o mas sustancias reguladoras, frecuentemente auxinas y/o citoquininas, pero a veces también giberilinas, ácido abscísico o etileno, para mejorar el desarrollo del cultivo *in vitro* de tejidos y órganos (MARGARA, 1988).

El requerimiento de estas sustancias, sin embargo, varía considerablemente con el tejido a usar para micropagar y depende fundamentalmente del nivel endógeno de fitohormonas naturales (SEEMANN, 1993).

Según MURASHIGE y SKOOG (1962), la iniciación de raíces y brotes en las plantas, se encuentra regulada básicamente por la interacción entre auxinas y citoquininas.

Aunque ambas hormonas son necesarias para el crecimiento de tejidos *in vitro*, el tipo de organogénesis que se presenta se encuentra relacionada o determinada por la concentración relativa de estas dos sustancias en el medio de cultivo. Así una relación auxina-citoquinina menor a uno favorece la brotación, mientras que si es mayor a uno se induce el enraizamiento de los explantes (MURASHIGE y SKOOG, 1962).

2.2.2.2.3.3.1 Auxinas. Son un grupo de fitohormonas que tienen la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular, y al mismo tiempo, promueven la división celular en el cultivo de tejidos. Además promueven la dominancia apical o inhibición del desarrollo de las yemas laterales por la yema apical (ROCA y MROGINSKI, 1991).

Las auxinas más utilizadas son el ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), 2,4-D y 2,4,5-T. De estas auxinas la que presenta mayor actividad en la formación de órganos es la AIA, pero es la más inestable frente a factores del medio como luz y temperatura (MURASHIGE y SKOOG, 1962).

El ácido indolacético (AIA) además de presentar la ventaja de ser natural, es el único que posee el menor efecto inhibitorio en la formación del tallo. Por otro lado el ácido naftalén acético (ANA) es una auxina fuerte, muy estable y se utiliza especialmente para promover la rizogénesis (MARGARA, 1988).

VIJAYA *et al.* (1991), en un estudio hecho en rosas, concluyó que la auxina, en combinación con la citoquinina BAP, que presenta mejores porcentajes de establecimiento y enraizamiento es el ácido naftalenacético (ANA) en concentraciones de 0.0 a 0.5 mg/L, en comparación con AIA y AIB.

2.2.2.2.3.3.2 Citoquininas. Dentro de las citoquininas más utilizadas se encuentran la bencil amino purina (BAP), dimetilalilaminopurina (2iP), kinetina (KIN) y zeatina (ZEA) en concentraciones comprendidas entre 0,01- 3 mg/L, según el tipo de desarrollo que se desee inducir (MURASHIGE y SKOOG, 1962).

Las funciones destacables de las citoquininas son la estimulación de la división celular, la inhibición de desarrollo de raíces laterales, el rompimiento de la latencia de yemas auxiliares, retrasan la senescencia o envejecimiento de los órganos vegetales y promueven la organogénesis en los callos celulares (ROCA y MROGINSKI, 1991).

Para estimular una proliferación de tejidos en los cultivos se utiliza frecuentemente una baja concentración de citoquininas, por el contrario, si se utiliza una elevada concentración, se favorece a la proliferación *in vitro* de meristemas axilares en cultivo de ápices y para reprimir la obtención de macollos de yemas (MARGARA, 1988).

Si se utiliza una concentración moderada de citoquinina, esta favorece a la formación de nuevas yemas sobre callos (MARGARA, 1988).

Según HASEGAWA (1980), la incorporación de BAP al medio, en una concentración entre 0,1 y 10 mg/L, es esencial para el inicio del enraizamiento.

2.2.2.2.3.3.3 Giberelinas. Existen varios tipos de giberelinas, siendo las más comunes las GA1, GA3 GA4 GA7 y GA9. En la planta cumplen variadas funciones, como por ejemplo biorregulador esencial en la organización de tejidos, reprimiendo los procesos de formación de callos y la iniciación de órganos en algunos casos (MURASHIGE y SKOOG, 1962).

Otras funciones destacables de las giberelinas según MARGARA (1988), son el incremento en el crecimiento de tallos, la inducción de la brotación de yemas, interrumpen el periodo de latencia de las semillas y promueven el desarrollo de los frutos.

2.2.2.2.3.4 Carbohidratos. Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono. La sacarosa (2-5%) es el azúcar mas utilizado ya que es el más fácil metabolizable por las plantas y se puede reemplazar por glucosa y en menor medida por fructosa (ROCA y MROGINSKI, 1991; SEEMANN, 1993).

DAVIES (1980), experimentó con porcentajes de sacarosa en el medio entre 2 y 8%, y concluyó que las mejores respuestas de los explantes, en cuanto a enraizamiento, fueron con concentraciones entre 4 y 5% en siete variedades de rosas.

PATI *et al.* (2005), indica que la concentración del 3% de sacarosa en el medio de cultivo, aumenta el largo y número de raíces de las plantas de rosa.

2.2.2.2.3.5 Agentes gelificantes. La mayoría de los medios utilizados incluyen un gelificante que impida que el explante se sumerja en el medio. Generalmente se utiliza agar-agar en concentraciones de 6-8 g/L o Gelrite en concentraciones de 1,5-3 g/L (SEEMANN, 1993).

En general, las sustancias nutritivas empleadas en los medios de cultivo, son gelificadas con agar, el cual forma un complejo coloidal con débil poder de retención iónica (MARGARA, 1988).

Según IBRAHIM (1994), el agar-agar es el agente gelificante más utilizado en los cultivos *in vitro*, ya que presenta numerosas características deseables, las cuales son, claridad, estabilidad y ser un agente inerte.

2.2.2.2.3.6 pH del medio de cultivo. SEEMANN (1993), indica que el pH se debe regular antes de adicionar el gelificante, y debe estar entre los valores 5 y 6,5, debido a que los valores menores o mayores pueden detener el crecimiento del explante.

Una vez ajustado el pH del medio, este sufrirá una ligera acidificación durante el proceso de esterilización en autoclave, además, el medio durante el transcurso de los días sufrirá una acidificación progresiva como resultado de la absorción de algunos componentes del medio, así como de la excreción de exudados por parte del explante, pudiendo producir así la licuación del medio de cultivo (GEORGE y SHERRINGTON, 1984).

2.2.2.3 Preparación del medio de cultivo. Una vez agregado el medio basal, revisado todos los componentes de medio de cultivo necesarios para el buen desarrollo del explante (reguladores de crecimiento), regulado el pH y adicionado el gelificante, se somete a una fuente de calor para disolver este gelificante y poder dispensarlo al frasco de cultivo, los cuales se cubren con láminas de aluminio, para luego ser llevados a un autoclave por 15 a 40 minutos a 121°C, para una eliminación de contaminantes microbianos y fungos presentes, tanto en el medio, como en el matraz (SEEMANN, 1993).

En China se han hecho estudios de la propagación *in vitro* de *R. canina*, obteniendo resultados del orden de un 87% de material enraizado. Como medio basal se usó el de MURASHIGE y SKOOG (1962), suplementado con 2 mg/L de 6-BA y 0,3 mg/L 2,4-D. Luego se elaboró otro medio, el cual arrojó los mejores resultados de enraizamiento, llegando a una propagación del 89% de las plantas. Este medio era a base de Murashige y Skoog, con 40 g/L de sacarosa, mas 6 g/L de agar, mas 3,6 g/L de AgNO₃, mas 1,5 mg/L de CPPU, mas 0,1 mg/L de 2,4-D y 0,05 mg/L GA₃ (CEPS, 2006).

Actualmente, existen muchos protocolos reproductivos para la propagación *in vitro* de rosa, sin embargo, los nuevos desafíos para la industria de la micropropagación son una eficacia económica, una automatización, un completo control y optimización del microambiente (PATI *et al.*, 2005).

2.2.2.4 Problemas en micropropagación. Tanto el establecimiento de cultivos *in vitro*, como su posterior propagación clonal, están afectados en la práctica por problemas que reducen drásticamente las posibilidades de éxito. Algunos de éstos son: pardeamiento de explantes y medio, y vitrificación (SEEMANN, 1993).

2.2.2.4.1 Pardeamiento. Tanto los explantes como el medio de cultivo de algunas especies, sobretodo leñosas, una vez puestas en cultivo *in vitro*, tienen la tendencia a manifestar un pardeamiento que, en forma extrema, lleve a la muerte de los explantes. Este pardeamiento se produce por acción de enzimas oxidasas y las tirosinasas, que se liberan al herirse los tejidos. La inhibición del crecimiento de los explantes, por otro lado, ocurre por la oxidación de los fenoles y la consecuente formación de compuestos quinónicos, altamente activos.

Alguna de las medidas para prevenir el pardeamiento son:

- Lavado de explantes por 2 a 24 horas antes de la siembra.
- Absorción de fenoles con carbón activado (3-5 g/L) o polivinilpirrolidona (0,5-2% PVP) de alto peso molecular.
- Incorporación al medio de Glutatión reducido (200 mg/L), Feniltiourea (15-20 mg/L) o L-cisteína (10-50 mg/L). Esto es para reducir el potencial redox del medio.
- Disectar el material vegetal en agua destilada estéril, en agua de coco o cultivando en medio líquido estacionario por unos días. Con ello se logra reducir la disponibilidad de oxígeno y por lo tanto, la oxidación de fenoles.
- Usar sustancias antioxidantes, como ácido cítrico (150 mg/L) o ácido ascórbico (100-150 mg/L) (SEEMANN, 1993).

2.2.2.4.2 Vitrificación. Es un desorden fisiológico que se presenta en ciertas especies herbáceas y algunas leñosas, caracterizado por el desarrollo de tejidos traslúcidos, hiperhidratados y suculentos, producto de condiciones poco adecuadas del cultivo. El fenómeno se manifiesta principalmente en las hojas, afecta a los procesos de fotosíntesis e intercambio gaseoso. La responsabilidad de estos fenómenos puede atribuirse a un exceso de humedad, especialmente en cultivos en medio líquido, un exceso de factores nutricionales, altos niveles de reguladores de crecimiento y baja intensidad lumínica. Los factores claves de la vitrificación parecen ser la humedad relativa y el potencial hídrico dentro del frasco de cultivo.

El problema puede ser disminuido en la práctica mediante las siguientes medidas de manejo:

- Incrementando la concentración de agar y/o sacarosa en el medio de cultivo o reemplazando parcial o totalmente el uso de Gelrite por agar.
- Regulando los niveles de citoquinina. Altas concentraciones de ésta a menudo incrementan el problema.
- Aumentando la intensidad lumínica.
- Cambiando el medio de cultivo por otro de diferente composición o reduciendo la concentración de éste.
- Usando medios de cultivo de dos fases, en los cuales se establece primero una fase sólida, que posteriormente se cubre con medio líquido.
- Mejorando el intercambio gaseoso del frasco de cultivo por medio del uso de diferentes sistemas de cubierta de éstos (SEEMANN, 1993).

3 MATERIAL Y METODO

3.1 Material.

Para el desarrollo de la presente investigación se requirió diversos materiales e instalaciones que se mencionan a continuación.

3.1.1 Ubicación de los ensayos. El trabajo práctico se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, ubicado en el Campus Isla Teja de la Universidad Austral de Chile en Valdivia.

3.1.2 Material vegetal. Se utilizó como material vegetal de propagación inicial yemas axilares de la zona basal, media y apical de *R. canina*, las cuales fueron extraídas de una planta previamente seleccionada (FOTOGRAFÍA 1). Esta planta fue colectada a partir de material clonal, procedente del ecotipo P-518 de *R. canina* seleccionado en Puelche S. A. y corresponde al individuo 0000969. Este material es originario del sector de Los Sauces (IX Región), el cual fue recolectado debido a sus características de color y madurez deseadas.



FOTOGRAFÍA 1 Yemas axilares (izquierda) y planta madre de *R. canina* propagada (derecha).

3.1.3 Medios de cultivo. Se utilizó el medio de cultivo MS (MURASHIGE y SKOOG, 1962) y el medio de cultivo WPM (LLOYD y McCOWN, 1981), a los cuales se les agregó hormonas del tipo auxinas (ácido naftalén acético, ANA) y citoquininas (bencil amino purina, BAP y 2-isopentil adenina, 2iP) a distintas concentraciones, para la obtención de una mejor respuesta de los explantes al establecimiento, multiplicación y enraizamiento. Una vez realizado esto, y previo a la disolución del medio en un microondas, se ajustó el pH entre 5,6 y 5,7, con hidróxido de potasio (KOH) 0,5N. Luego, con la ayuda de un dispensador, se dispensó 10 mL de medio en cada frasco, los cuales después de ser sellados con papel aluminio, se llevaron a un autoclave para ser esterilizados a 121° C durante 15 minutos.

3.1.4 Material de laboratorio. El material de laboratorio que se utilizó fue el siguiente: cámara de flujo laminar, agitador magnético, pHímetro, microondas, dispensador, balanzas, pipetas, vasos de precipitado, probetas, placas Petri, matraces, frascos de vidrio, pinzas, bisturí, detergente, hipoclorito de sodio, fungicida, bactericida, soluciones requeridas para la elaboración de los medios de cultivo.

3.2 Método.

El método utilizado para la elaboración de esta investigación fue el siguiente.

3.2.1 Obtención del material vegetal. El material vegetal fue recolectado de plantas seleccionadas en el sector de Los Ángeles para los diferentes ensayos. Luego de cortado el material y envasado en un Cooler, fue enviado al laboratorio para empezar la desinfección al día siguiente del corte del material. Para la desinfección de los explantes, primero se tuvo que extraer las yemas con un bisturí de los tallos embalados. Luego se sumergieron en una solución de fungicida (Captan 2,7 g/L) y bactericida (Agrept 0,5 g/L) por 20 minutos. Finalmente se procedió a lavar el material con agua destilada.

Una vez habiendo terminado con la desinfección externa, se procedió a ingresar el material a la cámara de flujo laminar para la desinfección final, la cual consistió en sumergir las yemas en alcohol 70% por 10 segundos, luego se remojó el material por 10 minutos en una solución de Hipoclorito de Sodio al 10%, con 4,9% de ingrediente activo, más una gota de detergente para romper la tensión superficial del agua. Posteriormente se procedió a lavar 3 veces las yemas con agua destilada estéril antes de sembrar.

3.2.2 Siembra de yemas. Una vez terminada la desinfección, se procedió a la limpieza de las yemas para luego sembrarlas en los frascos con 10 mL de medio de cultivo, dentro de la cámara de flujo laminar.

3.2.3 Condiciones ambientales. Realizados los pasos anteriores, los explantes fueron llevados a una sala de incubación del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, a una temperatura promedio de $22^{\circ}\text{C} \pm 8^{\circ}\text{C}$ con una intensidad lumínica de 2000 a 4000 lux y con un fotoperíodo de 16 horas luz.

3.2.4 Descripción de los ensayos. En esta investigación se diseñó distintos ensayos, para evaluar la respuesta de *R. canina* frente a medios de cultivo *in vitro* elaborados para el establecimiento, multiplicación y enraizamiento de la planta.

Además se realizó un ensayo que evaluó la época del año y el lugar de la planta de que provinieron las yemas para la micropropagación.

3.2.4.1 Establecimiento de *R. canina*: Para el establecimiento de *R. canina* se elaboraron tres diferentes ensayos, estos son: medio de cultivo, tipo de tejido y época del año.

3.2.4.1.1 Medio de cultivo: El ensayo se estableció en un diseño completamente al azar, con 6 tratamientos ordenados en un experimento factorial con los siguientes factores:

- 2 medios de cultivo: MS (MURASHIGE y SKOOG, 1962) y WPM (Woody Plant Medium de LLOYD y MC COWN, 1981).
- 3 combinaciones de reguladores:

→ Testigo

→ 0.1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP

→ 0.1 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP

Para este ensayo se hicieron 30 repeticiones por tratamiento.

3.2.4.1.2 Tipo de tejido: El ensayo se estableció en un diseño completamente al azar, con 18 tratamientos ordenados en un experimento factorial con los siguientes factores:

- 2 medios de cultivo: MS (MURASHIGE y SKOOG, 1962) y WPM (Woody Plant Medium de LLOYD y MC COWN, 1981).
- 3 combinaciones de reguladores:

→Testigo

→0.1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP

→0.1 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP

- 3 zonas de tejido: apical, medio y base.

Se consideraron en total 120 unidades experimentales, con 24 repeticiones para la zona de tejido apical y 48 repeticiones para cada una de las restantes zonas (basal y medio).

3.2.4.1.3 Época del año: El ensayo se estableció en un diseño completamente al azar, con 12 tratamientos ordenados en un experimento factorial con los siguientes factores:

- 2 medios de cultivo: MS (MURASHIGE y SKOOG, 1962) y WPM (Woody Plant Medium de LLOYD y MC COWN, 1981).
- 3 combinaciones de reguladores:

→Testigo

→0.1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP

→0.1 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP

- 2 épocas del año: 5 de Enero y 2 de Marzo.

Cada tratamiento tuvo 30 repeticiones.

3.2.4.2 Multiplicación de *R. canina*: El ensayo se estableció en un diseño completamente al azar, con 6 tratamientos más uno que será el testigo, ordenados en un experimento factorial con los siguientes factores:

- 2 distintas citoquininas: BAP (Bencil amino purina) y 2 iP (2-isopentil adenina).
- 3 combinaciones de reguladores:

→0.1 mg/L de ANA y 1 mg/L de citoquinina

→0.1 mg/L de ANA y 2.5 mg/L de citoquinina

→0.1 mg/L de ANA y 5 mg/L de citoquinina

Además se consideró un testigo, sin hormonas.

Para este ensayo se hicieron 20 repeticiones por tratamiento.

3.2.4.3 Enraizamiento de *R. canina*: El ensayo se estableció en un diseño completamente al azar, con 8 tratamientos ordenados en un experimento factorial con los siguientes factores:

- Medio de cultivo MS (MURASHIGE y SKOOG, 1962) con 100% y 50% de sus macro y microelementos.
- 4 dosis de auxina:

→Testigo

→0.05 mg/L de ANA

→0.1 mg/L de ANA

→0.2 mg/L de ANA

Para este ensayo se hicieron 25 repeticiones por tratamiento.

3.2.5 Variables evaluadas. En los ensayos se evaluaron las siguientes variables:

- % de sobrevivencia.
- Número de brotes.
- % de enraizamiento.
- Número de raíces.

Las evaluaciones fueron realizadas mensualmente a partir del ingreso del material vegetal.

3.2.6 Análisis de resultados. La forma de evaluación de los resultados de las variables antes mencionadas, fue la siguiente.

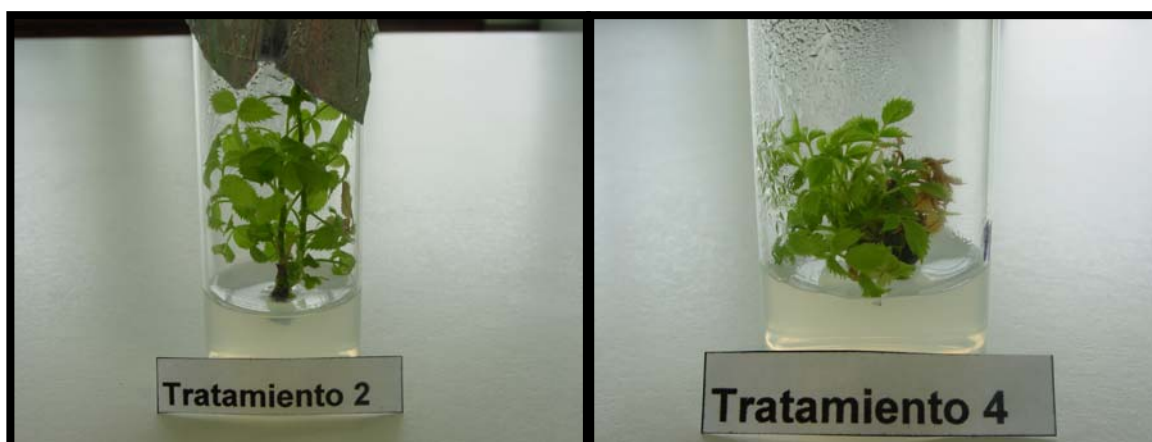
3.2.6.1 Porcentaje de sobrevivencia. Se calculó registrando aquellos brotes desarrollados en los explantes sin contaminantes, como se muestra en la FOTOGRAFÍA 2.



FOTOGRAFÍA 2 Cultivos sobrevivientes de *R. canina*

Los datos porcentuales corresponden al porcentaje de supervivencia, se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANDEVA) de Fisher y un test de comparación múltiple Tukey (DHS) al 5% de significación.

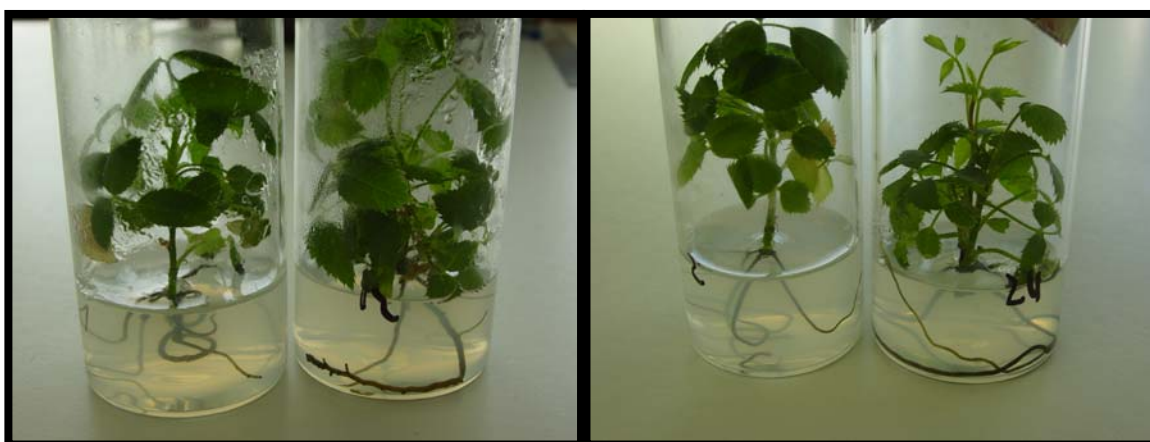
3.2.6.2 Número de brotes. Esta información de la cantidad de brotes se obtuvo a partir del brote desarrollado desde la yema dentro de cada frasco, como se muestra en la FOTOGRAFÍA 3.



FOTOGRAFÍA 3 Brotes de *R. canina*

La variable observada corresponde al número de brotes, estos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANDEVA) de Fisher y un test de comparación múltiple Tukey (DHS) al 5% de significación.

3.2.6.3 Porcentaje de enraizamiento y número de raíces. Este porcentaje se obtuvo a partir del número de raíces desarrollada desde la yema dentro de cada frasco, como se muestra en la FOTOGRAFÍA 4.



FOTOGRAFÍA 4 Plántulas de *R. canina* enraizadas.

Los datos obtenidos corresponden al porcentaje de enraizamiento, se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANDEVA) de Fisher y un test de comparación múltiple Tukey (DHS) al 5% de significación.

4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Ensayo de establecimiento de *Rosa canina* L.

Con el propósito de evaluar el establecimiento de la *R. canina* se analizó la información obtenida en los siguientes tres ensayos.

4.1.1 Ensayo de tipo de tejido. En este ensayo se evaluó la variable sobrevivencia. Los resultados obtenidos en este ensayo se resumen en la siguiente tabla de distribución de frecuencia de doble entrada.

CUADRO 2: Tabla de contingencia sobre porcentaje de sobrevivencia según tipo de tejido.

Tipo de tejido	Parámetro	No sobrevivió	Si sobrevivió
Ápice	% de sobrevivencia	42%	58%
Medio	% de sobrevivencia	58%	42%
Base	% de sobrevivencia	90%	10%

Como se puede apreciar en la tabla anterior, existe una clara diferencia en porcentaje de sobrevivencia del material procedente de la base (10%), y el material procedente del medio y ápice, que corresponde a un 42% y 58% respectivamente. Al realizar la prueba chi-cuadrado se obtuvo que, existe evidencia muestral altamente

significativa (valor $p = 0.000$) que permite afirmar que existe una fuerte asociación entre el tipo de tejido y la sobrevivencia (ver ANEXO 1.1a).

Lo anterior, también se confirma si se realiza la prueba de comparación múltiple de Tukey, post andeva (ver ANEXO 1.1b), como se muestra en el CUADRO 3, las cuales arrojan como resultado la separación del tipo de tejido que procede de la base. Este resultado confirma lo dicho por ROCA y MROGINSKI (1991), que dice que las yemas axilares de las rosas obtenidas de la parte media del tallo, se desarrollan mejor que aquellas obtenidas de la base, ya que el material juvenil presenta una mejor adaptación y respuesta a las condiciones dadas.

PATI *et al.* (2005), también indican que el mejor material para la micropropagación de *R. canina* es el proveniente de yemas apicales y axilares de la parte media de la rama del año.

MEDEROS y ENRIQUEZ (1987), nos indican que el material proveniente de maderas blandas (parte media y superior de la rama del año la de rosa) presenta mayor porcentaje de establecimiento que maderas duras o lignificadas, provenientes de la base.

CUADRO 3: Prueba de comparación múltiple de Tukey para evaluar sobrevivencia según tipo tejido.

	Lugar de procedencia del tejido	N	% sobrevivencia promedio grupo 1	% sobrevivencia promedio grupo 2
Tukey	Base	48	10%	
	Medio	48		42%
	Ápice	24		58%

Las pruebas de comparación múltiples permiten confirmar que el material procedente del medio y ápice de la rama del año, es el que presenta una mayor tasa de sobrevivencia en comparación con las yemas procedentes de la base, las cuales presentan un bajo nivel de sobrevivencia (sólo un 10%).

El porcentaje de sobrevivencia también se comparó considerando los distintos medios de cultivo, MS y WPM, obteniendo como resultado lo que se muestra en el CUADRO 4.

CUADRO 4: Porcentaje de sobrevivencia según medio de cultivo.

Medio de cultivo	N	Promedio	Error típ. de la media
MS	36	47%	8,40%
WPM	36	47%	8,40%

Al comparar la sobrevivencia entre los dos medios de cultivo, es evidente concluir que no hay ninguna diferencia entre los medios MS y WPM, ya que ambos obtuvieron un 47% de sobrevivencia.

Según DAVIES (1980), el medio MS es el medio que más se utiliza para la propagación de rosa, ya que presenta mejores porcentajes de establecimiento que WPM. Sin embargo, VAN DER SLAM *et al.* (1994), utiliza WPM para la propagación *in vitro*, obteniendo resultados cercanos al 60% de sobrevivencia.

Al realizar una comparación de la sobrevivencia entre los niveles de las concentraciones hormonales consideradas, se concluye estadísticamente que no existe evidencia muestral significativa (valor $p=0.496$) para establecer una diferencia entre las concentraciones hormonales ni tampoco con el tratamiento testigo (ver ANEXO 1.2). Pero si se toman en cuenta sólo los porcentajes de sobrevivencia, la concentración hormonal 0,1 mg/L ANA con 1 mg/L de BAP, arrojó un 54%, mientras que la concentración hormonal 0,1 mg/L de ANA con 2 mg/L de BAP arrojó un 38% de sobrevivencia, siendo un menor porcentaje que el testigo, el cual fue un 50%.

Por lo tanto, independiente de la concentración hormonal y del medio que se utilice, el porcentaje de sobrevivencia no varía en forma considerable, siendo el factor lugar de la planta de donde se extrae el material, lo primordial para tener éxito en este ensayo.

4.1.2 Época del año. En este ensayo se evaluó la variable porcentaje de sobrevivencia para las dos épocas del año consideradas, que son Enero y Marzo, cuyos resultados se presentan en la FIGURA 3.

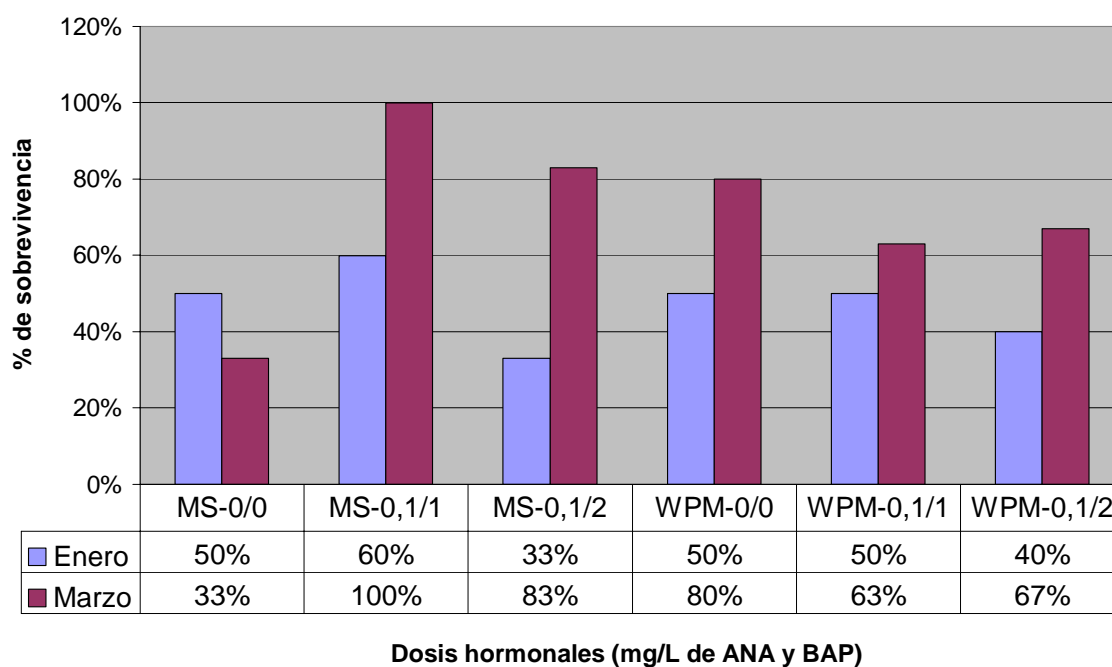


FIGURA 3 Porcentaje de sobrevivencia según dosis hormonal (auxina/citoquinina) y época del año.

Si se toma en cuenta los resultados obtenidos de las yemas extraídas en Marzo en comparación a las yemas extraídas en Enero, se puede deducir, que para la mayoría de los casos, excepto el testigo en el medio MS, presenta mayor porcentaje de sobrevivencia que las yemas obtenidas en Enero, siendo la que presenta mayor porcentaje la que se sembró en el medio MS con 0,1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP, alcanzando un 100% (ver ANEXO 6).

Ensayos de reproducción vegetativa mediante esquejes de *R. canina* realizados en la industria Puelche S. A., demuestran que la sobrevivencia del material aumenta en forma considerable entre el material extraído en Enero hasta aquel extraído en Mayo¹.

Al realizar un análisis de la variable porcentaje de sobrevivencia considerando un modelo factorial que incluye los factores de época, medio de cultivo y concentración hormonal, además de su correspondiente tabla ANDEVA (ver ANEXO 2), permite concluir que existe interacción entre estos factores y que la concentración hormonal es la variable que influye en mayor medida en tal interacción, lo que obliga a realizar un análisis por separado para cada nivel hormonal.

Por ende, en la FIGURA 4, se grafican los resultados obtenidos para el nivel testigo.

¹ Entrevista personal con el Sr. Eduardo Weldt Suazo, Biólogo y responsable del programa Cultivo de *Rosa canina* L., en Puelche S. A.

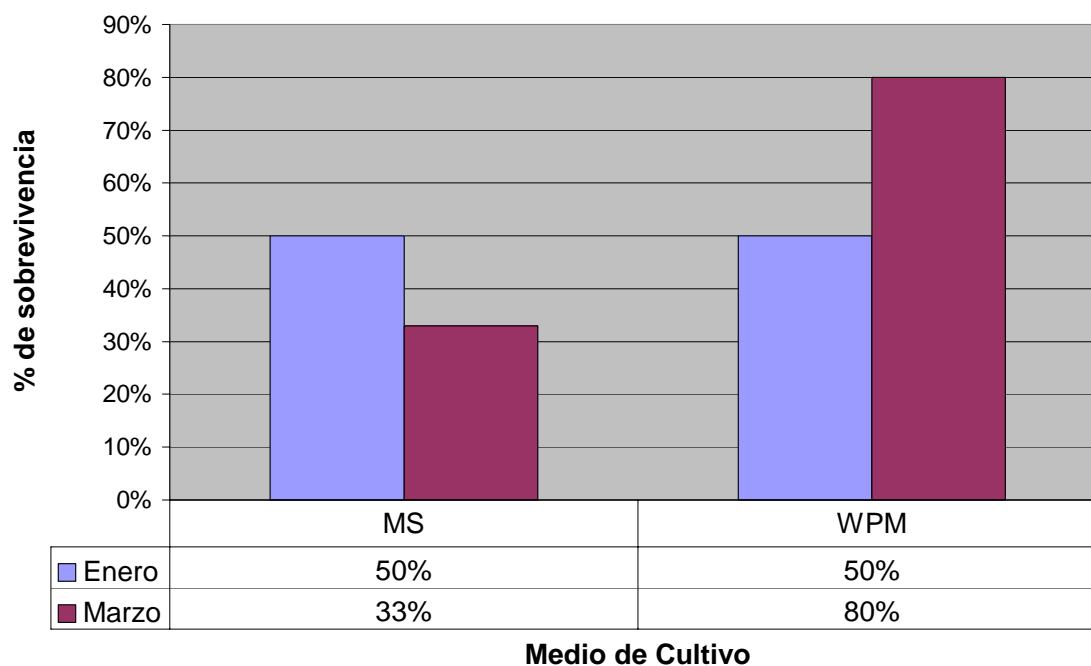


FIGURA 4 Porcentaje de sobrevivencia según medio de cultivo y época del año para el testigo.

El análisis de la variable sobrevivencia para el testigo, considerando un modelo factorial que incluye los factores de época y medio de cultivo a través de su correspondiente tabla ANDEVA (ver ANEXO 2.1), se puede concluir que existe interacción entre estos factores, como lo muestra la FIGURA 4, lo que se expresa en que el medio MS presenta un mayor porcentaje sobrevivencia en el mes de Enero (50%), en cambio, WPM presenta mayor porcentaje de sobrevivencia en el mes de Marzo. Y se puede concluir en general que, si no se aplica al medio ningún regulador de crecimiento, la mejor tasa de sobrevivencia la presenta el Medio WPM, alcanzando un 80%.

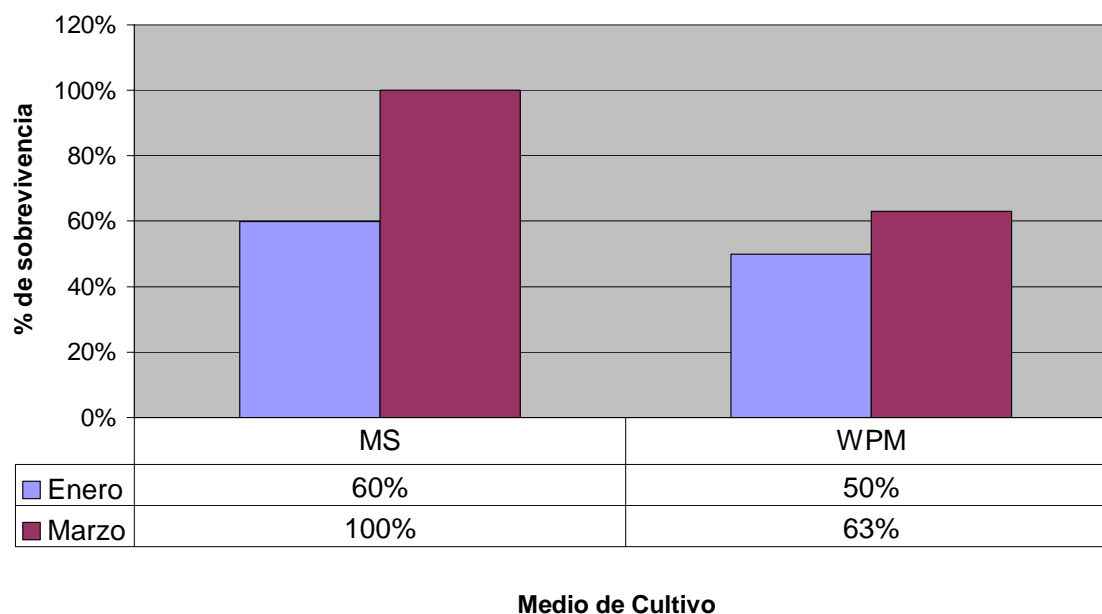


FIGURA 5 Porcentaje de sobrevivencia según medio de cultivo y época del año para la concentración hormonal 0,1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP en el medio.

El análisis de la variable sobrevivencia para la concentración hormonal 0,1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP, considerando un modelo factorial que incluye los factores de época y medio de cultivo, como se muestra en la FIGURA 5, a través de su correspondiente tabla ANDEVA (ver ANEXO 2.2), se concluye que no existe interacción entre estos factores. Además se concluye que existe diferencia significativa entre los niveles de cada factor por separado, en otras palabras, para el factor época, el mes de Marzo presenta la mas alta tasa de sobrevivencia (100%), mientras que para Enero, el medio MS presenta el mayor porcentaje, alcanzando un 60% de sobrevivencia.

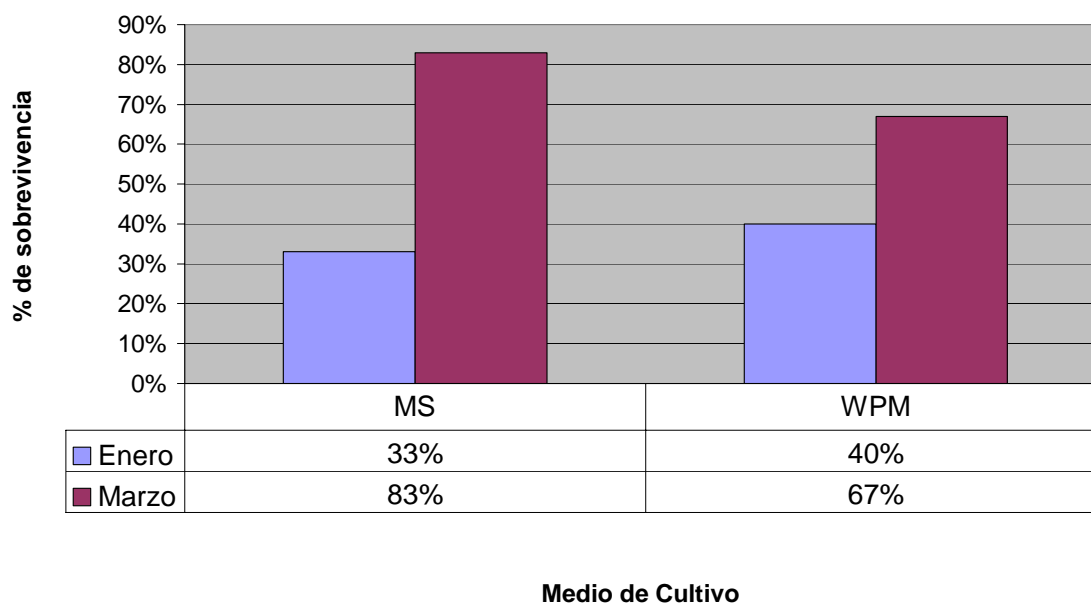


FIGURA 6 Porcentaje de sobrevivencia según medio de cultivo y época del año para la concentración hormonal 0,1 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP en el medio.

El análisis de la variable sobrevivencia para la concentración hormonal 0,1 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP, considerando un modelo factorial que incluye los factores época y medio, como se muestra en la FIGURA 6, mediante su correspondiente tabla ANDEVA (ver ANEXO 2.3), se concluye que no existe diferencia significativa entre los medios de cultivo, y tampoco existe interacción entre estos factores, es decir, independiente del medio de cultivo (MS o WPM), Marzo es la mejor época de extracción de yemas, alcanzando un porcentaje de sobrevivencia alrededor de un 83%.

4.1.3 Medio de cultivo. Al realizar un análisis de la variable sobrevivencia, considerando un modelo factorial que incluye los factores medio de cultivo y hormona, además de su correspondiente tabla ANDEVA (ver ANEXO 3a), permite concluir que existe interacción entre estos factores, y la concentración hormonal es el factor que

influye principalmente en tal interacción, lo que obligaría a realizar un análisis por separado para cada dosis de hormona.

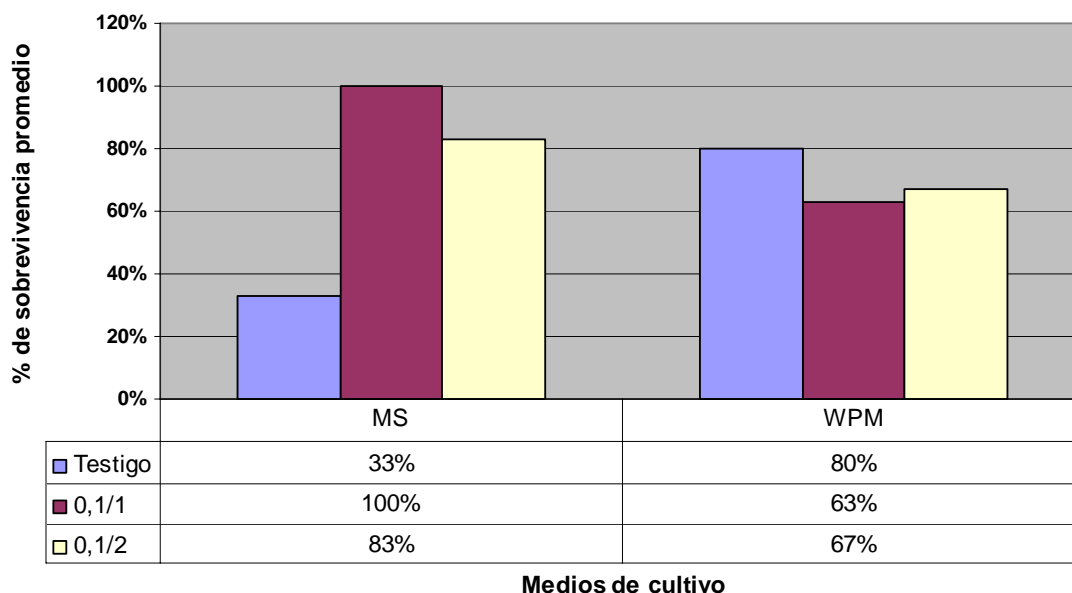


FIGURA 7 Porcentaje de sobrevivencia promedio según medio de cultivo y concentración hormonal en mg/L de ANA/BAP.

Al observar las tasas de sobrevivencia en la FIGURA 7, reflejan que la interacción se debe al distinto comportamiento que presenta el medio de cultivo sin hormonas. En otras palabras, el testigo presenta una mayor tasa de sobrevivencia en el medio WPM (80%), al contrario de los dos niveles hormonales (0,1/1 y 0,1/2 mg/L de ANA/BAP), que presentan un mayor porcentaje de sobrevivencia en el medio MS (100% y 83% respectivamente) (ver ANEXO 6), lo que se confirma al realizar la tabla ANDEVA de la variable sobrevivencia sin considerar este nivel.

Efectivamente, al realizar un análisis de la variable sobrevivencia considerando un modelo factorial que incluye solo los factores medio y hormona, sin el nivel testigo, además de su correspondiente tabla ANDEVA (ver ANEXO 3b), permite confirmar que no existe interacción entre estos factores y que no existe evidencia muestral

significativa para detectar diferencia entre los medios con concentración hormonal 0,1/1 y 0,1/2 mg/L de ANA/BAP. Además, se puede deducir que existe evidencia muestral altamente significativa (valor $p = 0.000$) que permite afirmar que hay diferencia entre los medios WPM y MS, donde este último, es el medio que presenta una mejor tasa de sobrevivencia, alcanzando un 100% con una concentración de 0,1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP.

4.2 Ensayo de multiplicación de *R. canina*. Con el propósito de evaluar el número de brotes de la *Rosa canina* L., se analizó la información obtenida en el siguiente ensayo.

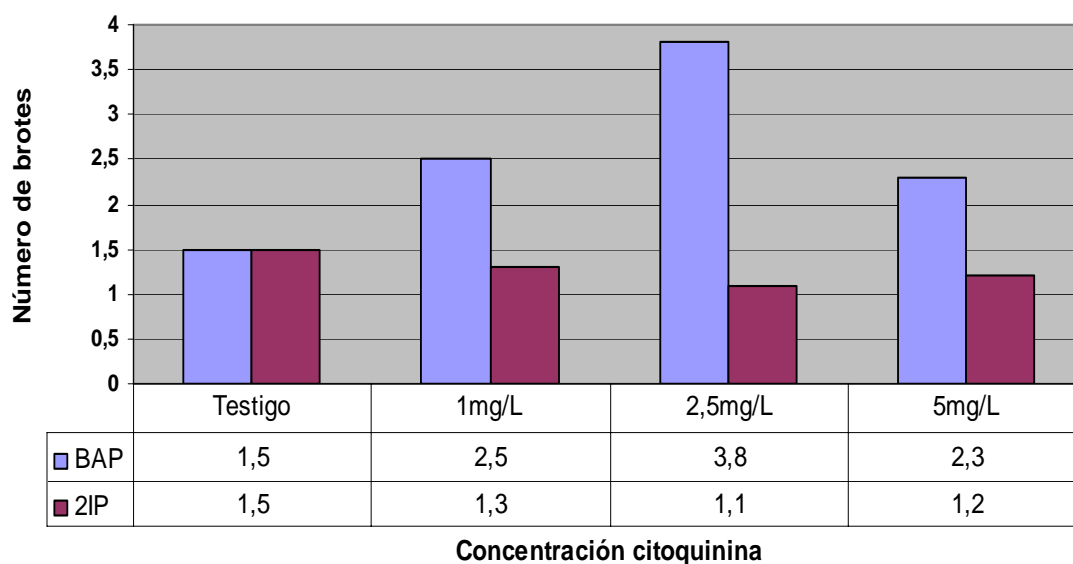


FIGURA 8 Promedio de número de brotes según distinta citoquinina y concentración hormonal.

Al realizar un análisis de la variable número de brotes, considerando un modelo factorial que incluye los factores de citoquininas y dosis hormonal, como se muestra en la FIGURA 8, además de su correspondiente tabla ANDEVA (ver ANEXO 4), permite concluir que existe interacción entre estos factores (valor $p = 0.006$), lo que obliga a realizar un análisis por separado para cada citoquinina utilizada.

El análisis para la citoquinina BAP indica que existe evidencia muestral altamente significativa (valor $p = 0.003$) para afirmar que hay diferencias entre las distintas dosis, por lo que se debe hacer la prueba de comparación múltiple de Tukey (ver ANEXO 4.1), que permiten concluir que la dosis 2,5 mg/L de BAP es la que presenta el mayor número de brotes (3,8 brotes), mientras la dosis 1 mg/L de BAP y la dosis 5 mg/L de BAP, presentan un número de brotes menor, pero similar entre ellos, pasando de 2,3 a 2,5 brotes respectivamente (ver ANEXO 6).

Lo obtenido en el ensayo concuerda con lo obtenido con KHOSH-KHUY y SINK (1982), quienes obtuvieron $3,6 \pm 0,15$ brotes por yema de *R. canina*, con una concentración de BAP entre 1 y 5 mg/L.

La incorporación de BAP al medio en una concentración entre 1 y 10 mg/L, es esencial para la multiplicación de distintos cultivares de rosa, obteniendo desde 2,5 a 8 brotes por yema (HASEGAWA, 1980; WULSTER y SACALIS, 1980).

El análisis para la citoquinina 2IP, se hizo en un modelo completamente aleatorio, que a través de su correspondiente tabla ANDEVA (ver ANEXO 4.2), se concluye que no existe evidencia muestral significativa (valor $p = 0.741$) para afirmar que hay diferencias entre las distintas dosis. En otras palabras, no existe un aumento significativo en el número de brotes si se aumenta o disminuye la concentración de 2IP, como se puede apreciar en la FIGURA 8.

El análisis de la variable número de brotes, con el objetivo de comparar todos los tratamientos, incluyendo el testigo, considerando un modelo completamente aleatorio, a través de su correspondiente tabla ANDEVA (ver ANEXO 4.3a), se puede concluir que existe evidencia muestral altamente significativa (valor $p = 0.000$) para afirmar que hay diferencias entre estos tratamientos.

La prueba de comparación múltiple de Tukey permite confirmar que el Tratamiento 2,5 mg/L de BAP es el que presenta el mayor número de brotes, y los niveles de concentración hormonal para la citoquinina 2IP no muestran diferencias con el tratamiento Testigo (ver ANEXO 4.3b).

Según BRESSAN *et al.* (1982), si se compara la citoquinina BAP con 2IP en un medio de cultivo, claramente existe mayor respuesta en número de brotes a favor de BAP, pasando de 1 a 2 brotes con 2IP, a 3 a 4 brotes con BAP.

4.3 Ensayo de enraizamiento. Con el propósito de evaluar el enraizamiento de la *R. canina* se analizó la información obtenida en el correspondiente ensayo.

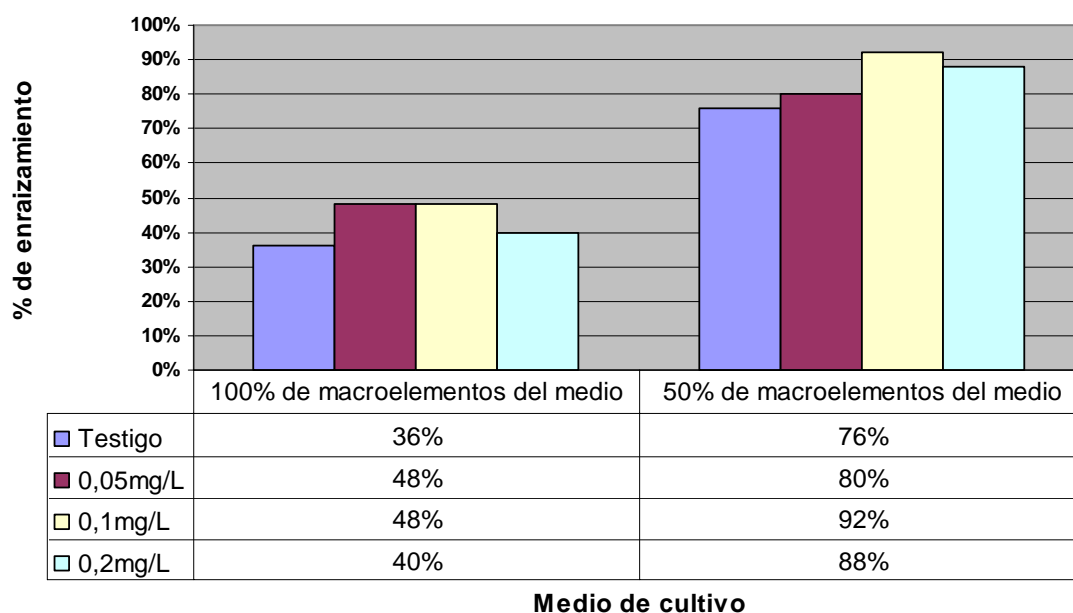


FIGURA 9 Porcentaje de enraizamiento promedio según concentración de macroelementos y dosis de auxina en el medio.

Al realizar un análisis de la variable presencia de raíces (porcentaje de enraizamiento), considerando un modelo factorial que incluye los factores medio y dosis hormonal, además de su correspondiente tabla ANDEVA (ver ANEXO 5.1), permite inferir que no existe interacción entre estos factores, como se observa en la FIGURA 9, y sólo se detecta diferencias significativas (valor $p = 0.000$) entre los niveles del factor medio a favor del 50% de los macroelementos, teniendo el mayor porcentaje de enraizamiento (92%) con una concentración hormonal de 0,1 mg/L de ANA.

Además se puede deducir que, independiente de la concentración hormonal que se incorpore al medio, para todos los casos, el medio de cultivo con el 100% de los macroelementos presenta una menor tasa de enraizamiento, alcanzando como máximo un 48% para 0,05 y 0,1 mg/L de ANA (ver ANEXO 6).

KHOSH-KHUI y SINK (1982), indican que el medio con la mitad de sus minerales y suplementado con ANA en una concentración 0.0 a 0.1 mg/L, es adecuado para inducir el enraizamiento, llegando a obtener un 85% en diversos cultivares de rosa.

ARNOLD *et al.* (1995), concuerda con los autores anteriores, y dice que el medio de cultivo suplementado con bajas concentraciones de auxinas, independiente de cual sea, o sin suplemento de esta, presenta un buen porcentaje de enraizamiento, obteniendo un 95% en el mejor de los casos, para algunos cultivares de rosa.

Según HASEGAWA (1980), el medio MS suplementado con 0,1 a 0,5 mg/L de auxina (ANA, AIA o AIB), no debería presentar dificultades para el enraizamiento del explante.

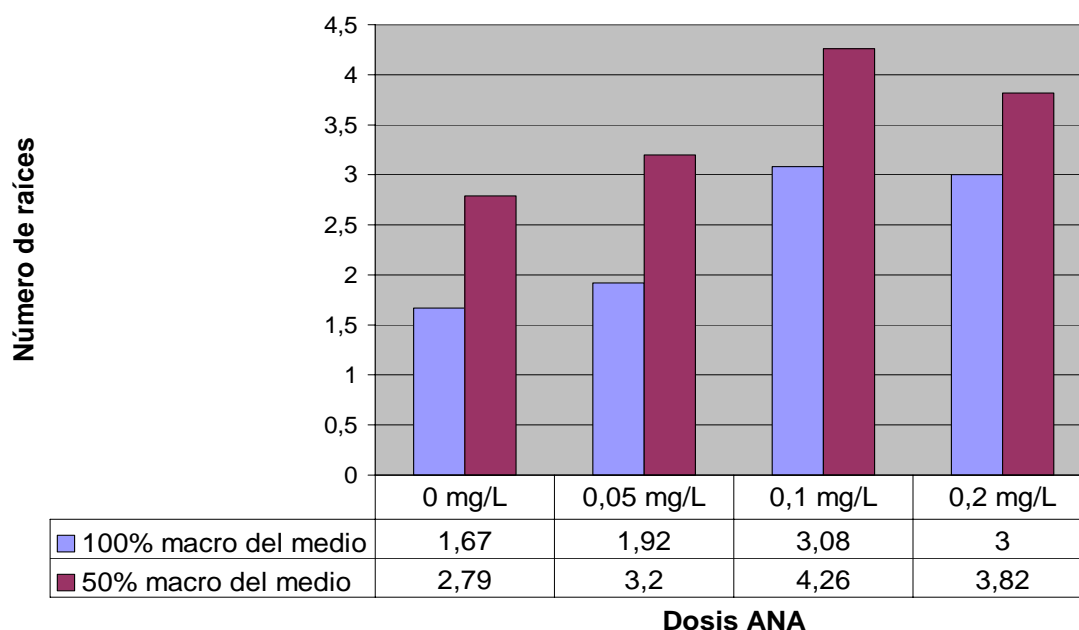


FIGURA 10 Número promedio de raíces según dosis de auxina (ANA) y porcentaje de macroelementos en el medio.

Al realizar un análisis de la variable número de raíces, considerando un modelo factorial que incluye los factores medio y hormona (dosis), además de su correspondiente tabla ANDEVA (ver ANEXO 5.2a), permite concluir que no existe interacción entre estos factores, y se detectan diferencias significativas entre el medio con 50% y 100% de macroelementos, siendo favorable el número de raíces para el primer medio en todas las concentraciones hormonales, alcanzando un promedio de 4,3 raíces por explante, con dosis de 0,1 mg/L de ANA (ver ANEXO 5.2b).

La prueba de comparación múltiple de Tukey (ver ANEXO 5.2c), permite concluir que las dosis que producen la mayor cantidad de raíces son 0,2 y 0,1 mg/L de ANA, con 3,6 y 3,9 raíces respectivamente.

Finalmente, al tomar en cuenta todos los ensayos realizados en la presente investigación, se concluye que, se acepta la hipótesis de que el cultivo *in vitro* es una alternativa viable para una propagación masiva de *Rosa canina* L.

5 CONCLUSIONES

Se puede concluir que, para la fase de establecimiento, el medio de cultivo MS es el que presenta mayor porcentaje de sobrevivencia, llegando a alcanzar un 100%, con una concentración hormonal de 0,1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP.

En relación al lugar de extracción de las yemas, estas deben ser extraídas de la zona apical y media de la planta, ya que de la zona basal el porcentaje de sobrevivencia es muy bajo (10%).

Independiente de los medios de cultivo y las concentraciones hormonales empleadas, Marzo es la mejor época de extracción de yemas, alcanzando porcentajes de sobrevivencia del 100%.

En cuanto al ensayo de multiplicación se puede concluir que, agregando la citoquinina BAP en concentraciones de 2,5 mg/L en el medio de cultivo, desarrolla un mayor número de brotes, con un promedio de 3,8 brotes por explante, en comparación a la citoquinina 2IP, la cual desarrolla un promedio de 0,9 brotes por explante.

Para la fase de enraizamiento, usando el medio MS con una concentración diluida al 50% de los macroelementos y con 0,1 mg/L de ANA en el medio de cultivo, el porcentaje de enraizamiento aumenta en forma considerable, llegando a un 92% con 4,2 raíces por planta.

6 BIBLIOGRAFIA

- ACEVEDO, R. 1997. Determinación de un método para interrumpir dormancia en achenios de rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa* L.). Memoria de título Ing. Agr. Universidad de Concepción, Fac. Agron. Chillán, Chile. 35p.
- ARNOLD, N., BINNS, M., CLOUTIER, C., BARTHAKUR, N., PELLERIN, R. 1995. Auxins, salt concentrations and their interactions during *in vitro* rooting of winter-hardy and hybrid tea roses. HortScience 30(7):1436-1440.
- BALDINI, E. 1992. Arboricultura general. Madrid, España. Mundi Prensa. 352p.
- BRESSAN, P., KIM, Y., HYNDMAN, S., HASEGAWA, P., BRESSAN, R. 1982. Factors affecting *in vitro* propagation of rose. J. Am. Soc. Hort. Sci. 107:979-90.
- CARELLI, B. y ECHEVERRIGARAY, S. 2002. An improved system for the *in vitro* propagation of rose cultivars. Sci. Hortic. 92:69-74.
- CHINESE ELECTRONIC PERIODICAL SERVICES (CEPS). 2006. Improving of *in vitro* plant regeneration frequency of *Rosa canina* L. (*Rosaceae inermis*). (On Line). <<http://www.chineseelectronicperiodicals.com/rosacanina/invitroplantregeneration.htm>> (29 marzo 2007).
- CONGER, B. 1981. Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. 273p.
- DAVIES, D. 1980. Rapid propagation of roses *in vitro*. Sci. Hortic. 13:385-389.

- EBERT, C. 1979. Utilización de corte fino claro de mosqueta como fuente pigmentante para yemas de huevos de ponedoras en jaulas. Memoria de título Ing. Agr. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Chillan, Chile. 38p.
- ESPINOSA, N. 1996. Malezas presentes en Chile. INIA, Carillanca, Temuco, Chile. 219p.
- FINOT, V., BERTI, J., JOUBLAN, H. SERRI, H. 1996. Variabilidad morfológica y caracteres diferenciales en plantas de rosa mosqueta en las regiones VIII – IX. *Simiente* 66(14):107.
- FUCHS, H. 1950. Rosales. Barcelona, España. Gustavo Gillis. 238p.
- GEORGE, E. y SHERRINGTON, P. 1984. Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories. Eversley, Basingstoke, England Exegetics. 709p.
- HARTMANN, H., KESTER, D., DAVIES, F. y GENEVE, R. 2002. Plant Propagation. Principles and Practices. New Jersey, Estados Unidos. Prentice Hall. 880p.
- HASEGAWA, P. 1980. Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 105(2):216-220.
- HOFFMANN, A., FORGA, C., LASTRA, J. y VEGHAZI, E. 1992. Plantas medicinales de uso común en Chile. Editorial Fundación Claudio Gay. Santiago, Chile. 267p.
- HORN, W. 1992. Micropropagation of rose (*Rosa* L.). In: Bajaj, Y.P.S., (Editor). *Biotechnology in Agriculture and Forestry* Vol. 20. High-tech and micropropagation IV. Heilderberg, Germany: Springer. 320p.
- HOSAFICI, H., ARSLAN, N. y SARIHAM, E., 2005. Propagation of dogrose (*Rosa canina* L.) plants by softwood cuttings. (On Line). <www.actahort.org/books/690/690_20.htm> (5 junio 2007).

- IBRAHIM, A. 1994. Effect of gelling agent and activated charcoal on the growth and development of *Cordyline terminalis* cultured *in vitro*. Proceedings of the First Conference of Ornamental Horticulture. Cairo, Egypt. October 22-24, p.55-67.
- INFOAGRO, 2003. El cultivo de rosas para corte. (On Line). <www.infoagro.com/flores/flores/rosas.htm> (20 mayo 2007).
- ISRAEL, M. y BENADO, S., 1977. Aspectos preliminares del aprovechamiento de la rosa mosqueta en Chile. *Alimentos* 2(1): 5-8.
- JOUBLAN, J. y BERTI, M., 1997. Rosa mosqueta: una nueva alternativa agrícola para zonas de secano. *Agroanálisis* 146: 29-33.
- JOUBLAN, J., BERTI, M., SERRI, H., HEVIA, F., WILCKENS, R., FINOT, L. y SALAS, C., 2000. Rosa mosqueta: cultivo y mercado. *Agroeconómico* (56): 32-39.
- KHOSH-KHUI, M. y SINK, K. 1982. Callus induction and culture of *rosa*. *Sci. Hortic.* 17:361-370.
- LEYHE, U. HORN, W. 1994. A contribution to micropropagation of *rosa hybrida*. *Gartenbauwissenschaft* 59(2):85-88.
- Li, X., KRASNYANSKI, S. y KORBAN, S., 2002. Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in *rosa*. (On Line). <<http://korban.nres.uiuc.edu/pub31.pdf>> (04 junio 2007).
- LLOYD, G. y McCOWN, B. 1981. Woody plant medium (WPM): A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant. species. *HortScience*. 16:453.
- MACROSCOPECHILE. 2008. Sistema de consultas aduaneras. (on line). <www.macroscopechile.cl> (10 mayo 2008).
- MARGARA, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemas y la organogénesis. Madrid, España. Mundi Prensa. 232p.

- MARTIN, C., CARRE, M. y VERNY, R. 1981. La multiplication vegetative *in vitro* des vegetaux ligneux cultives: cas des rosiers. C. R. Acad. Sci. Paris. 293:157-177.
- MATTHEI, O. 1995. Manual de las malezas que crecen en Chile. Santiago, Chile. Alfabeto Impresores, p.335-336.
- MEDEROS, S. y ENRIQUEZ, M. 1987. *In vitro* propagation of "Golden Times" roses: Factors affecting shoot tips and axillary bud growth and morphogenesis. Acta Hortic. 212:619-624.
- MEDINA, M. 2005. Organismos vegetales. Fundamentos de la organografía vegetal. (On line). <http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica_biologia/docencia/FMBvirtual/Micropropa/Micvegetal.htm> (05 abril 2007).
- MURASHIGE, T. y SHOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- PATI, P., RATH, S., SHARMA, M., SOOD, A. y SINGH, P., 2005. *In vitro* propagation of rose – a review. (On Line). <www.aseanbiotechnology.info/Abstract/21018038.pdf> (15 abril 2007).
- RAHMAN, S., HOSSAIN, M., ISLM, A. y JOARDER, O. 1992. Effects of media composition and culture conditions on *in vitro* rooting of rose. Sci. Hortic. 52: 163-169.
- REICHE, K. 1897. Estudios críticos sobre la flora de Chile. (On Line). <http://www.efloras.org/web_page.aspx?flora_id=60&page_id=1094> (08 abril 2007).
- ROCA, W. y MROGINSKI, L. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical. 969p.

- ROUHANI, Y., KHOSH-KHUI, M. y BASSIRI, A. 1976. Changes in ascorbic acid content of developing rose hips. J. Hort. Sci. 51: 375-378.
- SABJA, A. 1980. Métodos de propagación vegetativa de algunas especies leñosas chilenas con posibilidades ornamentales. Tesis Lic. Ing. For. Santiago. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales. 120p.
- SEEMANN, P. 1993. Utilización de técnicas de Micropropagación. In: BARRIGA, P. y NEIRA, M. (eds.). Avances en Producción y Sanidad Vegetal, Cultivos No Tradicionales. Valdivia. Universidad Austral de Chile, p.87-145.
- STRITZKE, S. 1962. Die Hagebutte: ein hochwertiger Vitaminspender. VeB Deutscher Landwirtschaftsverlag. Berlín, Alemania. 51p.
- SUDZUKI, F. 1992. Cultivo de frutales menores. Editorial Universitaria. Santiago, Chile, p.177-184.
- SUDZUKI, F. 1995. Como cultivar la rosa mosqueta. Chile Agrícola 21:29-31.
- VAN DER SALM, T., VAN DER TOORN, C., HANISCH TEN CATE, C., DUBOIS, L., DE VRIES, D. y DONS, H. 1994. Importance of the iron chelate formula for micropropagation of *Rosa hybrida* L. "Money way". Plant, Cell, Tissue & Organ Cult. 37: 73-77p.
- VIJAYA, N., SATYANARAYANA, G., PRAKASH, J. y PIERIK, R. 1991. Effect of culture media and growth regulators on *in vitro* propagation of rose. Curr. Plant. Sci. Biotechnol. Agric. 12:209-214.
- WOLTERING, E. 1990. Beneficial effects of carbon dioxide on development of gerbera and rose plantlets grown *in vitro*. Sci. Hortic. 44:341-345.
- WULSTER, G. y SACALIS, J. 1980. Effects of auxins and cytokinins on ethylene evolution and growth of rose callus tissue in sealed vessels. HortScience 15:736-737.

7 ANEXOS

ANEXO 1.1 Análisis de supervivencia según tipo de tejido

a) Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	GI	Significación
Chi-cuadrado de Pearson	19,81	2	0,000
N° de casos validos	120		

b) Tabla ANDEVA

	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Significación
Tejidos	4,346	2	2,173	11,567	0,000
Error	21,979	117	0,188		
Total	26,325	119			

ANEXO 1.2 Análisis de sobrevivencia según concentración hormonal (ANA/BAP)

Tabla ANDEVA

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Hormonas	0,361	2	0,181	0,709	0,496
Error	17,583	69	0,255		
Total	17,944	71			

Comparación múltiple de Tukey

	Auxina/Citoquinina (mg/L)	N	% Promedio sobrevivencia
Tukey	0,1/2	24	38%
	Testigo	24	50%
	0,1/1	24	54%

ANEXO 2 Análisis de sobrevivencia en ensayo época de extracción de material parental

Época	Tratamiento	N	% Promedio de sobrevivencia
Enero	MS-0/0	30	50%
	MS-0,1/1	30	60%
	MS-0,1/2	30	33%
	WPM-0/0	30	50%
	WPM-0,1/1	30	50%
	WPM-0,1/2	30	40%
Marzo	MS-0/0	30	33%
	MS-0,1/1	30	100%
	MS-0,1/2	30	83%
	WPM-0/0	30	80%
	WPM-0,1/1	30	63%
	WPM-0,1/2	30	67%

Tabla ANDEVA

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Época	5,136	1	5,136	24,541	0,000
Medio	0,025	1	0,025	0,119	0,730
Hormona	1,550	2	0,775	3,703	0,026
Época * Medio	0,003	1	0,003	0,013	0,908
Época * Hormona	1,539	2	0,769	3,676	0,026
Medio * Hormona	3,317	2	1,658	7,924	0,000
Época * Medio * Hormona	2,572	2	1,286	6,145	0,002
Error	72,833	348	0,209		
Total corregida	86,975	359			

ANEXO 2.1 Auxina/Citoquinina = Testigo

Época	Medio de Cultivo	Media	N	Error típ. de la media
Enero	MS	50%	30	9,3%
	WPM	50%	30	9,3%
	Total	50%	60	6,5%
Marzo	MS	33%	30	8,7%
	WPM	80%	30	7,4%
	Total	57%	60	6,5%
Total	MS	42%	60	6,4%
	WPM	65%	60	6,2%
	Total	53%	120	4,6%

Tabla ANDEVA

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Época	0,133	1	0,133	0,584	0,446
Medio	1,633	1	1,633	7,159	0,009
Época * Medio	1,633	1	1,633	7,159	0,009
Error	26,467	116	0,228		
Total corregida	29,867	119			

ANEXO 2.2 Auxina/Citoquinina = 0,1 mg/L ANA y 1 mg/L BAP

Época	Medio de Cultivo	Media	N	Error típ. de la media
Enero	MS	60%	30	9,1%
	WPM	50%	30	9,3%
	Total	55%	60	6,5%
Marzo	MS	100%	30	0,0%
	WPM	63%	30	8,9%
	Total	82%	60	5,0%
Total	MS	80%	60	5,2%
	WPM	57%	60	6,5%
	Total	68%	120	4,3%

Tabla ANDEVA

	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Significación
Época	2,133	1	2,133	11,422	0,001
Medio	1,633	1	1,633	8,745	0,004
Época * Medio	0,533	1	0,533	2,855	0,094
Error	21,667	116	0,187		
Total corregida	25,967	119			

ANEXO 2.3 Auxina/Citoquinina = 0,1 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP

Época	Medio de Cultivo	Media	N	Error típ. de la media
Enero	MS	33%	30	8,7%
	WPM	40%	30	9,1%
	Total	37%	60	6,3%
Marzo	MS	83%	30	6,9%
	WPM	67%	30	8,7%
	Total	75%	60	5,6%
Total	MS	58%	60	6,4%
	WPM	53%	60	6,5%
	Total	56%	120	4,6%

Tabla ANDEVA

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Época	4,408	1	4,408	20,703	0,000
Medio	0,075	1	0,075	0,352	0,554
Época * Medio	0,408	1	0,408	1,918	0,169
Error	24,700	116	0,213		
Total corregida	29,592	119			

ANEXO 3 Análisis de sobrevivencia en ensayo medio de cultivo

a) Tabla ANDEVA

	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Significación
Medio	0,022	1	0,022	0,132	0,717
Hormona	2,011	2	1,006	5,978	0,003
Medio * Hormona	5,678	2	2,839	16,878	0,000
Error	29,267	174	0,168		
Total corregida	36,978	179			

Medio de Cultivo	Auxina/Citoquinina (mg/L)	N	% promedio de sobrevivencia
MS	Testigo	30	33%
	0,1/1	30	100%
	0,1/2	30	83%
WPM	Testigo	30	80%
	0,1/1	30	63%
	0,1/2	30	67%

b) Tabla ANDEVA

	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Significación
Medio	2,133	1	2,133	13,903	0,000
Hormona	0,133	1	0,133	0,869	0,353
Medio * Hormona	0,300	1	0,300	1,955	0,165
Error	17,800	116	0,153		
Total corregida	20,367	119			

ANEXO 4 Análisis de número de brotes en ensayo de multiplicación

Tabla ANDEVA

	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Significación
Citoquininas	69,582	1	69,582	59,442	0,000
Dosis	9,395	2	4,697	4,013	0,021
Citoquininas * Dosis	12,707	2	6,354	5,428	0,006
Error	115,889	99	1,171		
Total corregida	211,39	104			

ANEXO 4.1 Análisis de número de brotes para BAP en ensayo de multiplicación

Tabla ANDEVA

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Dosis	24,822	2	12,411	6,631	0,003
Error	104,805	56	1,872		
Total corregida	129,627	58			

Comparación múltiple de Tukey

	Dosis Citoquinina (mg/L)	N	Número de brotes promedio grupo 1	Número de brotes promedio grupo 2
Tukey	5	19	2,3	
	1	20	2,5	
	2,5	20		3,8

ANEXO 4.2 Análisis de número de brotes para ZIP en ensayo de multiplicación

Tabla ANDEVA

	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Significación
Dosis	0,156	2	0,078	0,302	0,741
Error	11,083	43	0,258		
Total corregida	11,239	45			

ANEXO 4.3 Análisis de número de brotes incluyendo el tratamiento testigo en ensayo de multiplicación

a) Tabla ANDEVA

	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	103,129	6	17,188	15,502	0,000
Error	130,839	118	1,109		
Total corregida	233,968	124			

b) Comparación múltiple de Tukey

	Dosis Citoquinina (mg/L)	N	Número de brotes promedios			
			Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Tukey	2IP-2,5	16	1,1			
	2IP-5	15	1,2			
	2IP-1	15	1,3	1,3		
	Testigo	20	1,5	1,5	1,5	
	BAP-5	19		2,3	2,3	
	BAP-1	20			2,5	
	BAP-2,5	20				3,8

ANEXO 5.1 Análisis presencia de raíces en ensayo enraizamiento

Tabla ANDEVA

	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Significación
Medio	8,405	1	8,405	43,288	0,000
Hormona	0,495	3	0,165	0,850	0,468
Medio * Hormona	0,175	3	0,058	0,300	0,825
Error	37,28	192	0,194		
Total corregida	46,355	199			

5.2 Análisis de número de raíces en ensayo enraizamiento

a) Tabla ANDEVA

	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Significación
Medio	34,033	1	34,033	12,129	0,001
Hormona	39,258	3	13,086	4,664	0,004
Medio * Hormona	0,847	3	0,282	0,101	0,959
Error	333,899	119	2,806		
Total corregida	412,835	126			

b) Número de raíces

Medio	Dosis ANA (mg/L)	N	Número promedio de raíces
100% de los macroelementos del medio	0	9	1,7
	0,05	12	1,9
	0,1	12	3,1
	0,2	10	3
50% de los macroelementos del medio	0	19	2,8
	0,05	20	3,2
	0,1	23	4,3
	0,2	22	3,8

c) Comparación múltiple de Tukey

	Dosis ANA (mg/L)	N	Número promedio de raíces		
			Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Tukey	0	28	2,4		
	0,05	32	2,7	2,7	
	0,2	32		3,6	3,6
	0,1	35			3,9

