



Evaluación de tres niveles de auxinas y citoquininas para la obtención de plantas madre de rosa (*Rosa* sp.) Variedad Freedom en condiciones in vitro

Evaluation of three levels of auxins and cytokinins to obtain plant mother of rosa (*Rosa* sp.) Variety Freedom conditions in vitro

Maria Elena Jacinto Alcazar

RESUMEN:

La Evaluación de tres niveles de auxinas y citoquininas para la obtención de plantas madre de Rosa (*Rosa* sp.) variedad Freedom en condiciones in vitro, fue realizado en la Facultad de Agronomía- UMSA, los tratamientos fueron distribuidos en un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial, con nueve tratamientos y diez repeticiones, donde cada tratamiento estaba conformado por distintos niveles de concentración de BAP (6-Benzil amino-purina) ANA (Ácido Naftalenacético). Donde se determinó con mayor altura de planta y mayor número de hojas al tratamiento conformado por la concentración de 0,1mg/l de ANA (Ácido Naftalenacético), y 2,5mg/l de BAP (6-Benzil amino-purina), dando como promedio una altura de de vitroplanta de 40,34 mm. Con un número de 8 hojas en promedio. Así mismo el porcentaje de brotación es de 85,56%, porcentaje de sobrevivencia 88,89%, porcentaje de contaminación 15,56% y porcentaje de oxidación 31,11%.

PALABRAS CLAVE:

Rosa, cultivo In Vitro, explante, reguladores de crecimiento, variables de respuesta.

ABSTRACT:

Evaluation of three levels of auxins and cytokinins to obtain plant mother of Rosa (*Rosa* sp.) variety Freedom conditions in vitro was performed at the Faculty of Agronomy-UMSA, the treatments were distributed in a completely randomized design with bivariate, arranged with nine treatments and ten replications, where each treatment was conformed by different levels of concentration of BAP (6-benzyl furan) ANA (naftalenacético acid). Where it is determined with greater plant height and greater number of leaves made of treatment by the concentration of 0, 1 mg/l of ANA (naftalenacético acid), and 2, 5 mg/l BAP (6-benzyl furan), giving an average a height of from 40,34 mm vitroplanta With a number of 8 sheets in averaged. Same way sprouting percentage is 85,56% percentage of survival 88,89%, percentage of pollution 15.56% and percentage of oxidation 31.11%.

KEYWORDS:

Rose. in vitro culture, explant, growth regulators, response variables.

AUTORA:

Maria Elena Jacinto Alcazar: Carrera de Ingeniería Agronómica. Facultad de Agronomía. Universidad Mayor de San Andrés. Nuestra Señora de La Paz. helen_mary77@hotmail.com

Recibido: 15/05/2018. **Aprobado:** 31/07/2018.



INTRODUCCIÓN

La Rosa es una planta de gran interés comercial, actualmente es una de las flores más conocidas y cultivada como flor cortada debido a su insuperable belleza, la amplia variedad de colores y combinaciones llegan a tener una gran demanda.

El principal problema del cultivo de rosas en nuestro medio, es la obtención de plantas de alta calidad que estén libres de plagas y enfermedades, la rosa se propaga por vía asexual y sexual. Actualmente la forma de propagación más utilizada es asexualmente a través de esquejes, acodos y estacas y micropropagación in vitro.

Por lo tanto, la utilización de la micropropagación in vitro favorece con varias ventajas como es la alta tasa de multiplicación donde a partir de una muestra

de tejido se llegan a obtener una gran cantidad de vitroplantas.

El presente trabajo tiene como propósito de obtener el medio de cultivo óptimo para lograr el establecimiento del cultivo de rosa en condiciones in vitro con la finalidad de generar plantas madres que se encuentren libres de patógenos y enfermedades.

LOCALIZACIÓN

El trabajo de investigación se realizó en dependencias del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Carrera de ingeniería agronómica, Facultad de Agronomía perteneciente a la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), ubicada en la Zona San Pedro, Calle Héroes del Acre N° 1543 del Departamento de La Paz, Provincia Murillo a una altitud de 3650 m.s.n.m, a

16° 30'00" latitud Sur y 68° 08' 00" longitud Oeste del Meridiano de Grendwich.

MATERIALES

Material de laboratorio: Cámara de flujo laminar, Autoclave, Dispensador, Medidor de pH, Agitador magnético, Balanza analítica.

Material biológico experimental: Para el trabajo de investigación se utilizó muestras de Rosa de la variedad Freedom.

Material de escritorio: Cuaderno de notas, planillas para anotar el desarrollo de las vitroplantas de Rosa, computadora para guardar todos los datos recolectados, cámara fotográfica para mostrar el desarrollo de las vitroplantas.

Metodología

Procedimiento experimental (Etapa 0)

En la etapa 0 se seleccionó las condiciones físicas adecuadas para el desarrollo de las vitroplantas, se verifico el estado de sanidad de las muestras con la finalidad de que no influya en la obtención de buenos explantes.

Establecimiento del material vegetal a condiciones in vitro (Etapa I)

Preparación del medio de cultivo. El medio elegido para la introducción y desarrollo del material vegetal de rosa será el medio basal de Murashige y Skoog (1962), según lo recomendado por Hurtado en el año 1994.

Para la preparación del medio de cultivo se procedió a pesar en una balanza analítica todos los reactivos requeridos los cuales son: Medio basal Murashige Skoog, gelificante Agar, Sacarosa y el Myonositol, de acuerdo al requerimiento necesario de la cantidad de medio de cultivo a preparar para el trabajo de investigación.

Una vez pesado los reactivos se introducen los mismos a un vaso de precipitado con un contenido de 100ml de agua autoclavada, donde se añade con una pipeta graduada los reguladores de crecimiento auxina ANA y la citoquinina BAP, posteriormente se afora la solución a 200ml con agua autoclavada,

se realiza la medición de la acides (pH) del medio de cultivo, el mismo debe encontrarse estabilizado en un rango de 5,6 a 5,8. Si el pH se encuentra en un rango menor a 5,6 se le adiciona hidróxido de sodio NaOH en una concentración de 0,1 Normal, si el pH se encuentra en un rango mayor a 5,8 se le adiciona Acido Clorhidrico HCL en una concentración de 0,1 Normal, una vez estabilizado el pH se le agrega el agente gelificante Agar al medio de cultivo.

Se distribuye 15 ml de medio de cultivo a cada vaso de vidrio con la ayuda de un dispensador, se tapa con papel aluminio y se sella todo el borde superior de cada vaso con plastifilm de manera inmediata, con la finalidad de evitar cualquier tipo de contaminación fuera y dentro del autoclave. Posteriormente al sellado de los vasos se realiza la correspondiente identificación de cada uno de ellos de acuerdo a cada tratamiento en estudio y se lleva al autoclave.

Preparación del material vegetal

Para la preparación del material vegetal se debe retirar los agujones presentes a lo largo de los tallos, posteriormente al retirado de los agujones, los tallos serán disectados en varias partes con presencia de una yema lateral para cada muestra, el tamaño de la muestra debe ser de aproximadamente 10 mm de altura, con la finalidad de reducir la contaminación, mientras más pequeña sea la muestra menor será el riesgo de contaminación.

Desinfección del material vegetal

Para la desinfección del material vegetal, las muestras se lavaron con agua para retirar todas aquellas partículas que se encuentren alojadas en el material vegetal a desinfectar, retiradas las partículas se debe introducir el material vegetal en un frasco donde se agrega detergente concentrado, durante 20 minutos se debe agitar el frasco y posteriormente realizar el enjuague de las muestras. Las muestras serán llevadas a la cámara de flujo laminar de aire, donde se esterilizaran dentro de un vaso por inmersión, en una solución de alcohol de 150 ml al 70 % de concentración (v/v) durante 10 segundos, seguidamente se lleva a sumergir las

muestras durante 10 minutos en la solución de hipoclorito de sodio al 3% (v/v).

Introducción del material vegetal

Las muestras de Rosa variedad Freedom desinfectadas, juntamente con los medios de cultivo y el material de apoyo a usar para la siembra (mandil, barbijo, guantes, cajas petri, bisturís, mechero, sanitizador, pinzas y otros), serán llevados a la cámara de flujo laminar donde pasaran por esterilización con rayos U.V. durante 10 min.

Terminada la esterilización se procede a realizar la siembra de los explantes, con la ayuda de las pinzas se introducen las muestras a los vasos de vidrio que contienen medio de cultivo con la debida asepsia en el material que se está usando para la siembra, al finalizar la siembra los vasos de vidrio serán flameados a lo largo de los bordes superiores y serán sellados con plastifilm e identificados con los tratamientos correspondientes, los mismos serán llevados a la sala de crecimiento o sala de incubación donde se cuenta con ambientes controlados mínimamente requeridos, con temperaturas de 25-27°C y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

Diseño experimental

El diseño a utilizar será completamente al azar con nueve tratamientos y 10 repeticiones con un arreglo Bifactorial, el mismo está dado por el siguiente modelo lineal aditivo (Ochoa, 2007).

Modelo lineal aditivo

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} = una observación cualquiera.

μ = media de la población.

α_i = Efecto de la i-esima observación de concentración de auxina.

β_j = Efecto de j-esima observación de concentración de citoquinina.

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Interacción de la i - ésimo observación concentración de auxina con la j - ésimo observación de concentración de citoquinina. ε_{ijk} = Error experimental

Factores de estudio

Tabla 1. Factores de Estudio.

Factor A	Factor B
a1= 0,1mg ANA	b1= 0,5mg BAP
a2= 0,2mg ANA	b2= 1,5mg BAP
a3= 0,3mg ANA	b3= 2,5mg BAP

Tratamientos

Tabla 2. Tratamientos en Estudio de las Concentraciones de Hormonas.

Tratamiento	Combinación	Descripción
	a1b1	0,1mg ANA-0,5mg BAP
T2	a1b2	0,1mg ANA-1,5mg BAP
T3	a1b3	0,1mg ANA-2,5mg BAP
T4	a2b1	0,2mg ANA-0,5mg BAP
T5	a2b2	0,2mg ANA-1,5mg BAP
T6	a2b3	0,2mg ANA-2,5mg BAP
T7	a3b1	0,3mg ANA-0,5mg BAP
T8	a3b2	0,3mg ANA-1,5mg BAP
T9	a3b3	0,3mg ANA-2,5mg BAP

Variables de respuesta

Las variables de respuesta consideradas a evaluar en el establecimiento de *Rosa sp* variedad Freedom se muestran bajo el siguiente detalle:

Porcentaje de brotación de los explante.

Número de vitroplantas que lograron brotar de las yemas después de haber sido introducidas al medio de cultivo.

Porcentaje de supervivencia

Vitroplantas que lograron desarrollarse (expresar su totipotencia). La relación refiere al número de vitroplantas desarrolladas entre el número de vitroplantas totales.

Porcentaje de contaminación

Para determinar la variable se realizó la observación de cada unidad experimental, se contó las unidades que presentaban algún tipo de contaminación (presencia de hongos y/o bacterias).

Porcentaje de oxidación

Se identificó las unidades experimentales que presentan oxidación (coloración oscura en el medio de cultivo y en la parte basal del tallo

Altura de las vitroplantas

Se midió el alto de cada vitro planta desde la base de la yema hasta el largo del tallo expresado en milímetros.

Número de hojas

Se contó el número de hojas de cada vitroplanta a partir de los 15 días de haber sido establecido en el medio de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Brotación de los explantos

El porcentaje de brotación de los explantes de Rosa de la variedad Freedom es de 85,56% de vitroplantas de un total de 90 vitroplantas en estudio, en la Figura1, se puede observar que los tratamientos con mayores porcentajes de brotación son el tratamiento tres (0,1mg ANA-2,5mg BAP) y el tratamiento seis (0,2mg ANA2,5mg BAP) expresando 100% de brotación de un total de 10 vitroplantas en estudio.

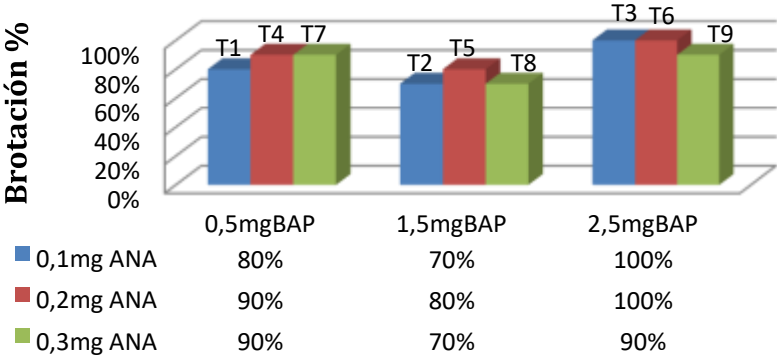


Figura 1. Porcentaje de Brotación de Explantes de Rosa variedad Freedom.

Espinoza (2018), menciona que las auxinas también son requeridas para el crecimiento de brotes, como los ápices vegetativos constituyen zonas activas de biosíntesis de estas. Las yemas menores a 0,4 mm no producen o retienen suficientes auxinas endógenas, lo que hace necesario la aplicación de auxina exógena a los medios de cultivo.

Porcentaje de sobrevivencia

El porcentaje de sobrevivencia es de 88,89% de vitroplantas de un total de 90 vitroplantas en estudio, a la misma vez se puede observar en la Figura 2, que los tratamientos con mayores porcentajes de sobrevivencia son el tratamiento uno (0,1mg ANA-0,5mg BAP) y el tratamiento nueve (0,3mg ANA-2,5mg BAP) expresando 100% de sobrevivencia a los primeros días de haber sido introducidas al medio de cultivo.

Porcentaje de contaminación

El porcentaje de vitroplantas no contaminadas de 84,44 % dando un 15,56 % de vitroplantas contaminadas del total de 90 vitroplantas en estudio, el tratamiento número nueve (0,3mg ANA-2,5mg BAP) con mayor porcentaje de contaminación en relación a los demás tratamientos.

Pérez (1998), indica que la contaminación del cultivo in vitro es uno de los principales problemas en la industria de la micropropagación. Los contaminantes pueden originarse de dos fuentes distintas, primeramente aquellos que vienen en la superficie o en los tejidos de la planta donadora y en segundo lugar los que aparecen como resultado de las fallas en los procedimientos de laboratorio.

Evaluación de tres niveles de auxinas y citoquininas para la obtención de plantas madre de rosa (Rosa sp.) Variedad Freedom en condiciones in vitro.

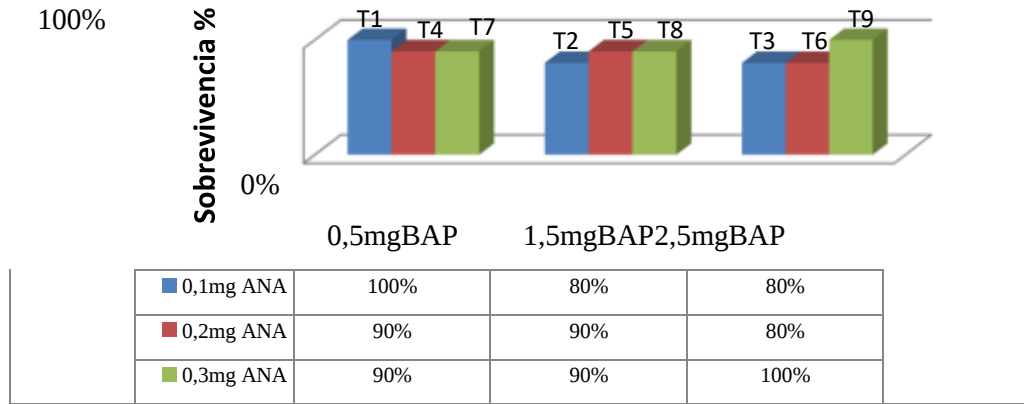


Figura 2. Porcentaje de Supervivencia de Explantes de Rosa variedad Freedom.

Porcentaje de oxidación

se observa un porcentaje de vitroplantas oxidadas de 31,11 % y un 68,89 % de plantas que no presentaron oxidación, de un total de 90 vitroplantas en estudio, el mismo cuadro muestra que los mayores porcentajes de oxidación recaen en el tratamiento cuatro (0,2mg ANA-0,5mg BAP) presentando un 50 % de oxidación de un total de 10 tratamientos en estudio, también se debe mencionar que todos los tratamientos presentaron % de oxidación, esto debido principalmente al daño que sufre los tejidos en el momento de realizar los cortes de la parte basal de las muestras de Rosa de la variedad Freedom a ser introducidas al medio de cultivo.

Altura de planta

El análisis de varianza de la variable altura de planta se observa un coeficiente de variación de 7,70%, por lo que podemos indicar que los datos obtenidos son confiables.

Tabla 3. Análisis de Varianza altura de Vitroplanta.

F.V.	S.C	G.L	C.M	F	p-valor
FACTOR A (auxina ANA)	31,12	2	15,56	2,71	0,0724ns
FACTOR B(CITOQUININA BAP)	2268,62	2	1134,31	197,80	<0,0001**
FACTOR A*B	172,83	4	43,21	7,53	<0,0001**
ERROR	464,50	81	5,73		
TOTAL	2937,06	89			

Según el análisis de varianza que se observa en el Cuadro 3, nos presenta que el factor A (auxina ANA) no presenta significancia, pero en el factor B (citoquinina) y la interacción del factor A*B presentan diferencias significativas a un nivel de 5% de significancia.

Tabla 4. Prueba Duncan del Factor B: Citoquinina (BAP)

Concentración de ANA	MEDIAS	N	E.E.	
2,5mg	38,5	30	0,44	A
1,5mg	28,88	30	0,44	B
0,5mg	26,37	30	0,44	C

Para el factor B se encontró alta significancia por lo que se efectuó la prueba de medias de Duncan (5% de significancia); en el Cuadro se observa el resultado, donde se puede afirmar que existen diferencias entre los tres niveles de concentración de citoquinina en relación a la altura de planta, dando como resultado con mayor porcentaje de altura de planta a una concentración de BAP 2,5mg/L, sin embargo este valor es estadísticamente superior a las concentración de 1,5mg/L, por otra parte estos valores son significativamente superiores a la concentración de 0,5mg/L.

Tabla 5. Prueba Duncan para el factor A* Factor B:(ANA*BAP).

FactorA*factor B	MEDIA	N	E.E.	S
0,1mg *2,5mg	40,34	10	0,76	A
0,3mg* 2,5mg	37,84	10	0,76	B
0,2mg* 2,5mg	35,97	10	0,76	B
0,2mg*1,5mg	31,27	10	0,76	C
0,3mg*1,5mg	27,85	10	0,76	D
0,1mg*1,5mg	27,53	10	0,76	D
0,1mg*0,5mg	27,10	10	0,76	D E
0,2mg*0,5mg	26,83	10	0,76	D E
0,3mg*1,5mg	25,17	10	0,76	E

Para el factor A * B se encontró alta significancia por lo que se efectuó la prueba de medias de Duncan (5% de significancia); en el Cuadro 5 se observa el resultado, donde se puede afirmar que existen diferencias significativas entre las interacciones del factor A con el factor B, dando como mejores resultados las interacciones de 0,1mg ANA * 2,5mg BAP.

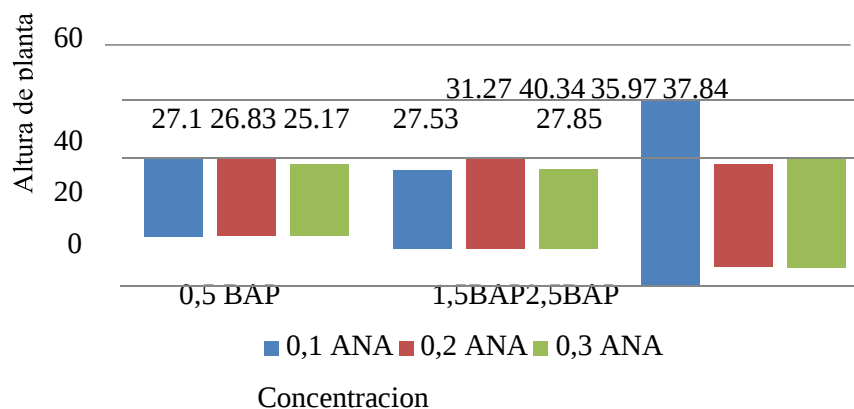


Figura 3. Efecto de los tratamientos altura de vitroplantas.

La Figura 3, muestra que los niveles de concentración que presentan mayor altura de planta son aquellas con menor concentración de auxinas y mayor concentración de citoquininas. Así también se debe destacar que las interacciones entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo producen crecimiento de los explantes.

Murillo (2014), indica que las posibles respuestas con citocininas son: división celular, inducción a la formación de tallos y proliferación de yemas axilares, inhibición de la formación de raíces.

Número de hojas

Para el análisis de varianza de esta variable se observa un coeficiente de variación de 13,50 % el cual se encuentra dentro de los rangos permitidos por lo que los datos obtenidos son confiables.

Tabla 6. Análisis de Varianza Número de Hojas.

F.V.	S.C	G.L	C.M	F	p-valor
FACTOR A(auxina ANA)	4,27	2	2,13	3,15	0,0483
FACTOR B(CITOQUININA BAP)	51,67	2	25,86	38,11	<0,0001**
FACTOR A*B	21,27	4	5,32	7,84	<0,0001**
ERROR	54,90	81	0,56		
TOTAL	132,10	89			

Según el análisis de varianza que se observa en el Cuadro 6, el factor B (BAP) es altamente significativo donde presenta diferencias significativas en los tres niveles de concentraciones de por otro lado la interacción A x B (ANA x BAP) presenta alta significancia a un nivel de 5% de significancia.

Tabla 7. Prueba Duncan para el Factor B (Citoquinina).

Concentración de BAP	MEDIAS	N	EE	
2,5 mg	7,1	30	0,15	A
2,5 mg	5,93	30	0,15	B
0,5 mg	5,27	30	0,15	C

Para el factor B se encontró alta significancia por lo que se efectuó la prueba de medias de Duncan (5% de significancia); en el Cuadro 7 se observa el resultado, donde se puede afirmar que existen diferencias en los tres niveles de concentración de citoquininas, dando como resultado con mayor porcentaje de número de hojas a la concentración de 2,5 mg/L BAP, sin embargo esta concentración es superior a la concentración de 1,5 mg/l BAP, por otro lado ambas concentraciones son superiores en cuanto a los resultados de número de hojas a la concentración 0,5 mg/l BAP.

Tabla 8. Prueba Duncan para el Factor A* Factor B: (ANA*BAP).

FactorA* Factor B	MEDIA	N	E.E.	
0,2mg *2,5mg	7,60	10	0,26	A
0,1mg* 2,5mg	7,50	10	0,26	A
0,1mg* 1,5mg	6,70	10	0,26	B
0,3mg*2,5mg	6,20	10	0,26	B C
0,3mg*0,5mg	5,80	10	0,26	C D
0,2mg*1,5mg	5,60	10	0,26	C D E
0,3mg*1,5mg	5,50	10	0,26	C D E
0,2mg*0,5mg	5,10	10	0,26	D E
0,1mg*0,5mg	4,90	10	0,26	E

Para el factor AxB se encontró alta significancia por lo que se efectuó la prueba de medias de Duncan (5% de significancia); en el Cuadro 8 se observa el resultado, donde se puede afirmar que existen diferencias entre las interacciones del factor A con el factor B, dando como mejores resultados las interacciones de 0,2mg ANA * 2,5mg BAP, sin embargo este valor es estadísticamente superior a los demás niveles de concentraciones que se encuentran en interacción entre ANA * BAP.

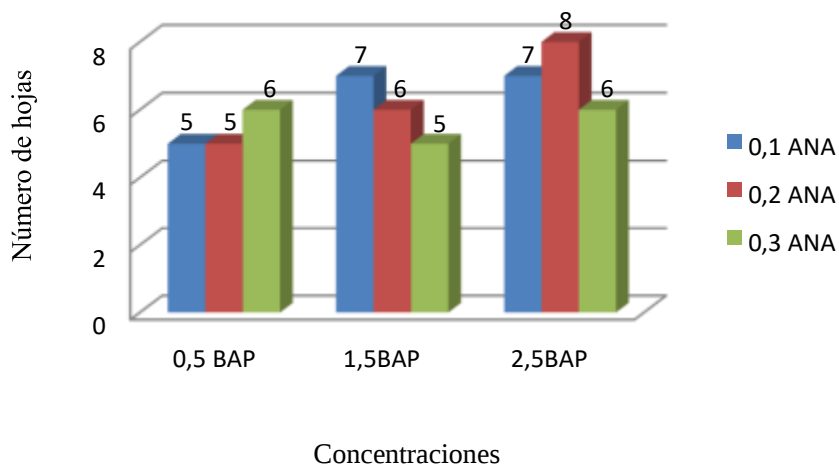


Figura 4. Efecto de tratamientos número de hojas.

La Figura 4 se muestra que los niveles de concentración que presentan mayor número de hojas se dan usando 2,5mg/l de BAP y 0,2mg/l de ANA dando mayor número de hojas en comparación a los de más tratamientos. Margara

(1988), indica que es necesario uno o más sustancias reguladoras de crecimiento, frecuentemente auxinas y/o citoquininas, pero a veces también giberelinas, ácido abscisico o etileno para mejorar el desarrollo del cultivo in vitro de tejidos y órganos.

CONCLUSIONES

El uso de reguladores de crecimiento, Auxinas y Citoquininas en el medio de cultivo Murashige Skoog favorecen a la obtención de vitroplantas madre de Rosa (*Rosa sp.*) variedad Freedom.

En cuanto al desarrollo de los explantes de Rosa (*Rosa sp.*) variedad Freedom, se observó un mejor crecimiento añadiendo al medio de cultivo las concentraciones de 0,1mg/l de Ácido naftalenacetico (ANA) y 2,5 mg/l de 6-benzil amino purina (BAP), dando como promedio de altura de 40,34 mm.

En cuanto al desarrollo de numero de hojas , usando la concentración de 0,2mg/l de Ácido naftalenacetico (ANA) y 2,5 mg 6-benzil amino purina (BAP) en el medio de cultivo, se obtuvo mayor número de hojas en las vitroplantas presentando como promedio 8 hojas , a la misma se destaca que el regulador de crecimiento que intervine en el desarrollo de las hojas de vitroplantas de Rosa (*Rosa sp.*) variedad Freedom , es el 6-benzil amino purina (BAP) por tanto en los distintos niveles de concentración que se adiciono al medio de cultivo dieron diferentes resultados, añadiendo 2,5 mg/l de 6-benzil amino purina (BAP) nos dio un promedio de 7 hojas, usando 1,5 mg/l de 6-benzil amino purina (BAP) 6 hojas como promedio, y por ultimo usando 0,5 mg/l de 6-benzil amino purina (BAP) como promedio 5 hojas , mientras mayor sea la adición de 6-benzil amino purina (BAP) al medio de cultivo mejores serán los resultados en el desarrollo de las hojas de Rosa (*Rosa sp.*) variedad Freedom.

En cuanto al riesgo de contaminación presente en las vitroplantas dio un porcentaje de 15,56 por ciento de presencia de hongos en el medio de cultivo, esto debido a que las muestras de rosa podrian haber tenido presencia de hongos, este porcentaje de contaminación también se debe al manejo inadecuado de algún material utilizado en el momento de preparación del medio de cultivo y en el momento de introducción de los explantes.

El riesgo de oxidación nos dio como porcentaje 31,11 por ciento de un total de 90 vitroplantas en estudio, este resultado principalmente se debió a los tejidos dañados que se produjeron en el momento del corte de los explantes. Esta oxidacion se debe alas acción de las enzimas oxidasas y las tirosinasas que se liberan al herirse los tejidos.

La concentración optima de auxinas y citoquininas en el establecimiento de Rosa (*Rosa sp.*) variedad Freedom es de 0,1mg/l de ANA (Ácido Naftalenacetico), y 2,5mg/l de BAP (6-benzil amino-purina), cabe recalcar que mientras mayor sea el nivel de citoquinina mejores resultados se obtendrán en el desarrollo de las plantas madre de Rosa (*Rosa sp.*).

RECOMENDACIONES

Para contrarrestar el efecto de oxidación se recomienda adicionar antioxidantes al medio de cultivo como ser el ácido ascórbico, ácido cítrico, y carbón activo, se recomienda cambios de medio de cultivo cada vez que se observe fenolización o con una frecuencia regular.

Para evitar la contaminación se recomienda tener más asepsia en el manejo de las vitroplantas y añadir antibióticos en el momento de preparación del medio de cultivo.

Se recomienda hacer investigaciones usando mayores cantidades de concentración de la fitohormona BAP (6- benzil aminopurina) dentro de los parámetros recomendados en el cultivo in vitro en la fase de establecimiento.

Se recomienda hacer investigaciones usando yemas apicales, yemas basales para el establecimiento de Rosas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Espinoza, R. (2013). *Biotecnología Agrícola: Introducción a la Biotecnología Vegetal*. Esp. 1° ed. BO. Universitaria. 68p.
- Hurtado, D. y Merino, M. (1994). *Cultivo de tejidos Vegetales*. Editorial Trillas México D. F.S.A. 226p.

Evaluación de tres niveles de auxinas y citoquininas para la obtención de plantas madre de rosa (*Rosa* sp.) Variedad Freedom en condiciones in vitro.

- Mangara, J. (1988). *Multipliación vegetativa y cultivo invitro, los meristemas y la organogénesis*. Madrid, España. Mundi prensa.232p.
- Medina, M. (2005). *Organismos vegetales. Fundamentos de la organografía vegetal*. <http://www.unizar.es/departamentos/bioquimicabiologia/docencia/FMBvisual/Micropropa/Micvegetal.htm>. (05 abril 2007).
- Murillo, R. (2014). *Introducción a la Biotecnología Agrícola: Historia del cultivo de tejidos vegetales*. Esp. 1° ED. Bo. MMAYA. 101p.
- Ochoa T. R. (2007). *Diseños experimentales*. La Paz, Bolivia. 298 p.
- Pérez, J. (1998). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. 179-191p.
- Penacho *et al.* (2007). *Cultivo invitro*. Consultado en octubre del 2016 disponible en: <http://www.wetea2udl.es/invitro/meristpat.htm>
- Quiroz, W. (2014). *Evaluación del comportamiento del botón de a variedad de Rosa (Rosa sp.) Freedom, usando cinco colores de capuchón en la finca florícola Manuela Tabacundo*. Tesis de Licenciatura. Universidad Politécnica Salesiana sede Quito.35p.
- Rojas, P. (2003). *Propagación de plantas: Principios y prácticas*. Séptima Reimpresión. Traducido por: Marino, A. Compañía Editorial Continental S.A. México D.F. 760 p.
- Sabja, A. (1980). *Métodos de propagación vegetativa de algunas especies leñosas chilenas con posibilidades ornamentales*. Tesis de Licenciatura. Santiago. Universidad de Chile Facultad de ciencias forestales.119-120p