

Ensayo agroeconómico para el establecimiento de *Rosa multiflora* Thund. *in vitro*

María del Pilar Paz Castillo



Zamorano-Honduras
Abril, 2000

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

**Ensayo agroeconómico para el
establecimiento de *Rosa multiflora* Thund. *in*
*vitro.***

Tesis presentada como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el grado
académico de Licenciatura

Por:

María del Pilar Paz Castillo

Honduras: Abril, 2000

El autor concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.



María del Pilar Paz Castillo

Zamorano-Honduras
Abril, 2000

DEDICATORIA.

A Dios y la Virgen por ser mis guías y amigos fieles en lo que llevo de vida. Señor, tú has sido la paz durante la tormenta.

A mis papás, Pablo e Irma de Paz, por siempre ser un ejemplo en mi vida, unos excelentes padres, buenos consejeros y lindos amigos.

A José Luis Barros por su eterna comprensión, paciencia y amor incondicional.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios por derramar tantas bendiciones sobre mí. Por su amor eterno e inquebrantable, a pesar de todos mis errores y debilidades. Mil gracias Señor por llevarme de la mano por el camino correcto y darme la serenidad que tanto necesitaba.

A mis papás por apoyarme en mis decisiones, en especial el apoyo que me brindaron durante la elaboración de la tesis. Gracias siempre por su comprensión.

A José Luis, por tu amistad sincera, los momentos de alegría, todo el apoyo y ayuda que me has brindado, un gracias es poco por todo lo que has hecho. Pero sobre todo, por haberme ofrecido tu corazón tan puro y tierno.

A Indiana (hermanita), por ser una amiga como ninguna otra, los consejos, tu cariño sincero y los momentos inolvidables que hemos compartido.

A Dinie de Rueda, por su apoyo, consejos y confianza profesional.

A Miguel Avedillo, por los regalos tan sutiles y las lecciones de vida. Algo he aprendido, no se preocupe.

Al Dr. Raúl Espinal, porque a pesar de lo ocupado que está, buscó el tiempo para ayudarme.

Al Arq. Fernando Fuentes por su ayuda con las flores tropicales.

Al Dr. Isidro Matamoros por su disposición y ayuda en la parte estadística, gracias por demostrarme lo que es ser un verdadero profesional.

A Rodolfo Pacheco, por su ayuda desinteresada y tan bien recibida.

A mis amigos, Luis Valdés, Estuardo Erales, Carlos Cbaris y Hector Ferreira, por ser más que amigos, sino que hermanos, por todos los momentos alegres, consejos, regalos y cariño.

Al grupo católico Promesas, en especial a Jenny, Dulce, Oscar, Perico, Lulú, Luis A. Lucas, Nies, Danny y Lemán, por ser mis hermanos espirituales y compartir sus vidas conmigo.

A Frances, Belinda, Andrea, la Chilo, Milred, Xiomara, Klemcn y todos mis amigos que se graduaron sin mí el año pasado, gracias por siempre bríndarme una mano amiga.

A Zoila Sandoval y Ericka Salgado por ser tan buenas compañeras, alegrarme siempre el día y por todo lo que me ayudaron para hacer esta tesis.

A la familia Míselem Santamaría por su guía espiritual.

A la familia Fromm Madrid por su hospitalidad y amabilidad.

A la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), en especial al Dr. Guy Self, Ing. José Alfonso e Ing. Hector Aguilar, por toda la ayuda que me brindaron en mi estadía en dicha institución y con mi tesis original.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

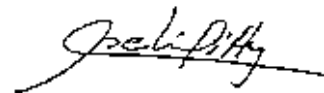
Al Fondo ~~D~~otal Hondureño por haberme patrocinado mi cuarto año y parte de mi carrera de agrónomo.

RESUMEN

Paz, María. 2000. Ensayo agroeconómico para el establecimiento de *Rosa multiflora* Thund. *in vitro*. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, El Zamorano, Honduras. 61 p.

La rosa miniatura (*Rosa multiflora*) es importante para la decoración de jardines. El cultivo *in vitro* tiene la ventaja que produce plantas que florecen más temprano y de mejor estructura. La ventaja más importante es que la micropropagación por yemas axilares produce mucho más material que las estacas tradicionales. Este método trae problemas biológicos, como la contaminación y la oxidación de los explantes. Con el propósito de controlar la oxidación en el establecimiento de la rosa miniatura se probaron tres tipos de medio: un medio testigo (medio A) sin antioxidantes; uno con ácido ascórbico y ácido cítrico como antioxidantes, a razón de 50 mg/L cada uno (medio B); y uno con carbón activado (medio C) que absorbe los compuestos fenólicos del medio. Para promover más brotación de las yemas se probaron cinco concentraciones de BAP (bencilaminopurina) a 0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L y tres de AIA (ácido indoleacético) a 0, 0.1 y 0.2 mg/L. La menor oxidación se logró con el medio C, pero éste redujo los pesos de los brotes porque posiblemente también absorbió los reguladores de crecimiento. El medio B produjo los brotes de mayor peso y una baja oxidación. Con 1-2 mg/L de BAP y sin AIA se produjeron los brotes de mayor peso y una baja oxidación. En términos de costos, el medio B con 2.0 mg/L de BAP y 0-0.2mg/L de AIA resultó en los más bajos por brote producido. Agroeconómicamente, la combinación recomendada para el establecimiento de rosa miniatura es el uso de ácido cítrico y ácido ascórbico para el control de oxidación y concentraciones de 2.0 mg/L de BAP, sin uso de AIA.

Palabras claves: Acido ascórbico, ácido cítrico, AIA, BAP, carbón activado, micropropagación,



 Abelino Pitty, Ph.D.

NOTA DE PRENSA

¿Desea establecer la rosa miniatura *in vitro*?

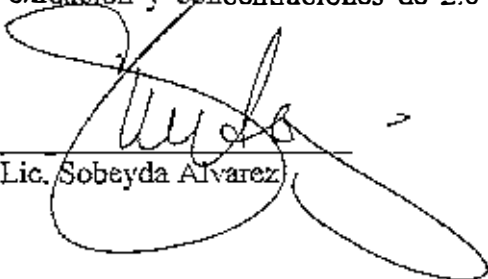
La rosa miniatura, arbustos muy buscado para la decoración de jardines y hogares, no sólo se puede propagar por la forma tradicional de estacas. Existe la propagación *in vitro*, mejor conocida como cultivo de tejidos, en la cual una pequeña porción de tallo con una yema se siembra en un medio nutritivo y nace una nueva planta. Esta técnica produce plantas que florecen más temprano y de mejor estructura, en comparación con las propagadas por estacas.

Esta técnica, aunque es bastante sencilla, presenta algunos problemas, como son problemas de brotación, oxidación y contaminación del explante. Estas razones condujeron a realizar un ensayo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación de Zamorano, en el cual se probaron tres tipos de medio para control de oxidación. El primero (medio A), el testigu, sin antioxidantes; el segundo (medio B), con ácido ascórbico y ácido cítrico a razón de 50 mg/L, como antioxidantes; y el tercero (medio C) con carbón activado, que absorbe compuestos fenólicos del medio.

Para lograr una mejor brotación se probaron cinco niveles de BAP (bencilaminopurina) a 0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L y tres de AIA (ácido indoleacético) a 0, 0.1 y 0.2 mg/L.

El mejor control de oxidación se logró con el medio C, pero éste redujo el peso de los brotes porque posiblemente también absorbió los reguladores de crecimiento. El medio B controló adecuadamente la oxidación y produjo los mejores pesos de los brotes. Con una dosis de 1-2 mg/L de BAP y sin AIA se produjeron los mejores pesos de brotes y una baja oxidación.

El medio B con 2.0 mg/L de BAP y 0-0.2 mg/L de AIA produce los brotes menos costosos, en término de costo por brotes producido. Agroeconómicamente, la combinación recomendada para el establecimiento de rosa miniatura *in vitro* es el uso de ácido ascórbico y ácido cítrico para el control de oxidación y concentraciones de 2.0 mg/L de BAP, sin uso de AIA.


 Lic. Sobeyda Alvarez

CONTENIDO

	Portadilla	i
	Autoría	ii
	Página de Firmas.....	iii
	Dedicatoria.....	iv
	Agradecimientos	v
	Agradecimientos a patrocinadores.....	vi
	Resumen.....	viii
	Nota de prensa.....	ix
	Contenido.....	x
	Índice de Cuadros.....	xii
	Índice de Figuras.....	xiv
	Índice de Anexos.....	xvii
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1	EL CULTIVO <i>IN VITRO</i>	4
2.2	MICROPROPAGACIÓN.....	5
2.2.1	El explante	5
2.2.2	Contaminación	6
2.2.3	Medio nutritivo	7
2.2.3.1	Azúcar	8
2.2.3.2	Nutrición mineral	8
2.2.3.3	Reguladores de crecimiento.....	9
2.2.3.4	Otros compuestos.....	10
2.2.3.5	Agar.....	10
2.2.4	El cuarto de crecimiento.....	11
2.2.5	Problemas biológicos de cultivo	11
2.2.5.1	Oxidación.....	11
2.2.5.2	Vitrificación.....	13
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1	LOCALIZACIÓN.....	14
3.2	MATERIAL VEGETAL.....	14
3.3	EL EXPLANTE	14
3.4	DESINFECCIÓN.....	15
3.4.1	Pruebas preliminares.....	15
3.4.2	Esterilización superficial.....	16
3.5	MEDIO NUTRITIVO.....	16

3.5.1	Preparación del medio.....	18
3.6	CRISTALERÍA E INSTRUMENTOS	19
3.7	SIEMBRA.....	19
3.8	CUARTO DE CRECIMIENTO.....	19
3.9	VARIABLES ESTUDIADAS.....	20
3.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
3.11	ANÁLISIS ECONÓMICO.....	21
3.12	ESQUEMA GENERAL DE INVESTIGACION.....	21
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1	RESPUESTA FISIOLÓGICA.....	23
4.1.1	Oxidación.....	23
4.1.2	Necrosis.....	26
4.1.3	Peso promedio del brote por explante (PPB).....	27
4.1.4	Callo.....	31
4.1.5	Vitificación.....	33
4.2	ANÁLISIS ECONÓMICO	35
4.2.1	Determinación de costos.....	35
4.2.2	Evaluación estadística de costos.....	36
4.2.3	Evaluación económica: productividad máxima y costo mínimo.....	37
5.	CONCLUSIONES	38
6.	RECOMENDACIONES	39
7.	BIBLIOGRAFÍA	40
8.	ANEXOS	42

INDICE DE CUADROS

Cuadro

1.	Pre-ensayo de manejo de contaminación en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	15
2.	Composición de los medios nutritivos para control de oxidación en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	17
3.	Combinaciones de concentraciones (mg/l) de BAP y AIA para el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000 ..	18
4.	Efecto de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) sobre la oxidación en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	24
5.	Efecto de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) sobre la necrosis en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	26
6.	Efecto de tres niveles de AIA (mg/l) sobre la necrosis a las dos semanas de la siembra en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	27
7.	Efecto de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) sobre el peso promedio (g) del brote por explante en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	28
8.	Efecto de cinco niveles de BAP (mg/l) sobre el peso promedio (g) del brote por explante en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	28

9.	Efecto de tres niveles de AIA (mg/l) sobre el peso promedio (g) del brote por explante en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	29
10.	Efecto de tres niveles de AIA (mg/l) sobre la presencia de callo (%) en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	32
11.	Efecto de la interacción de tres niveles de AIA (mg/l) con tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) sobre la presencia de callo (%) en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	32
12.	Efecto de cinco niveles de BAP (mg/l) sobre la vitrificación (%) en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	33
13.	Efecto de la interacción de cinco niveles de BAP (mg/l) con tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) sobre la vitrificación (%) en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	34
14.	Costo por medio de cultivo y por brote estándar producido en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	35

INDICE DE FIGURAS

Figura

1.	Esquema general de investigación para el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	22
2.	Efecto de la interacción de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) con cinco niveles de BAP (mg/l) sobre la oxidación a las dos semanas de la siembra en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	24
3.	Efecto de la interacción de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) con tres niveles de AIA (mg/l) sobre la oxidación a las cinco semanas de la siembra en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	25
4.	Efecto de la interacción de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) con tres niveles de AIA (mg/l) sobre el peso promedio (g) del brote por explante en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	29
5.	Efecto de la interacción de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) con cinco niveles de BAP (mg/l) sobre el peso promedio (g) del brote por explante en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	30

INDICE DE ANEXOS

Anexo

1.	Segmento nodal para el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000	42
2.	Yema brotada en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000	43
3.	Lamina foliar abierta en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000	44
4.	Categorías de vigor en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000	45
5.	Categorías de contaminación en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	46
6.	Categorías de oxidación en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	47
7.	Categorías de necrosis en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	48
8.	Presencia de callo en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	49
9.	Presencia de vitificación en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	50
10.	Análisis de varianza de las variables estudiadas en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	51
11.	Efecto de la interacción de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) con cinco niveles de BAP (mg/l) sobre la oxidación a las dos semanas de la siembra en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	54

12.	Efecto de la interacción de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) con tres niveles de AIA (mg/l) sobre la oxidación a las cinco semanas de la siembra en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000	54
13.	Efecto de la interacción de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) con tres niveles de AIA (mg/l) sobre el peso promedio (g) del brote por explante en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000	55
14.	Efecto de la interacción de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) con cinco niveles de BAP (mg/l) sobre el peso promedio (g) del brote por explante en el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	55
15.	Costos totales (US\$) por tratamiento para el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 200.....	56
16.	Evaluación estadística de costos promedios para el establecimiento <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	58
17.	Evaluación económica: costos mínimos para el establecimiento de rosa miniatura <i>in vitro</i> , El Zamorano, Honduras, 2000.....	60

1. INTRODUCCION

La rosa miniatura (*Rosa multiflora* Thunb.) pertenece a la familia Rosaceae, una de las familias de mayor importancia en la horticultura ornamental. Tradicionalmente, su propagación se ha realizado por medio asexual a través del uso de estacas o injertos. Estos métodos dependen de grandes cantidades de material inicial, lo que toma mucho tiempo en coleccionar. Según George (1996), los métodos de propagación *in vitro* de rosas ofrecen una excelente alternativa a los antiguos métodos, además de que esta tecnología es lo suficientemente confiable para la aplicación comercial.

El cultivo *in vitro* es factible ya que estas rosas se propagan normalmente por estacas (Bressan, *et al.*, 1982). La micropropagación, que se define como una multiplicación masiva *in vitro* (CIAT, 1991), permite la propagación masiva de cultivares comerciales. La rosa miniatura micropropagada tiene una mejor apariencia y característica floral en comparación a la producida por estaca, ya que florea más temprano y produce brotes más cortos (George, 1996). Esto puede aumentar su valor, ya que el uso más común que se le da a estas rosas es como planta de maceta o de bordes en jardines.

Según George (1996), la micropropagación de rosa se logra a través del cultivo de yemas axilares o vástagos, el cual se basa en la formación de brotes múltiples, lo que nos trae un aumento rápido del material vegetal. La eficiencia de este sistema está dado por el número de plantas obtenidas, lo cual se determina por el número de yemas axilares preexistentes en el explante (CIAT, 1991), pudiéndose producir más de una planta por explante sembrado.

La micropropagación dentro del laboratorio se da en tres etapas primordiales. La primera etapa (etapa I) considera el establecimiento *in vitro* del cultivo a propagar. En la segunda etapa (etapa II) se multiplica masivamente el cultivo a través de varios ciclos de multiplicación. La tercera etapa (etapa III) considera el enraizamiento y endurecimiento del material vegetal, para luego llevarlo a condiciones de invernadero (etapa IV). Tradicionalmente el aumento de material vegetal se ha limitado a la segunda etapa, pero éste puede iniciarse desde la primera etapa, ya que la yema sembrada puede producir más de un brote en la etapa establecimiento.

El establecimiento del explante es el proceso con el mayor número de variables en la ciencia inexacta del cultivo de tejidos. Un cultivo se puede considerar establecido y en el estado de multiplicación tan pronto pueda ser dividido exitosamente (Kytö, 1987). Pero son muchos los factores que influyen en la etapa de establecimiento, como la procedencia del material vegetal del cual se obtienen los explantes, la edad del material y la posición de las yemas en el tallo.

Según Kyte (1987), lo más difícil de establecer explantes es limpiarlos exitosamente. Al referirse a limpieza no sólo se trata de la limpieza superficial, sino que también de limpieza interna. Para lograr este objetivo es necesario que la planta madre esté libre de enfermedades, lo cual nos asegura evitar la contaminación con microorganismos que es un aspecto básico para el éxito del establecimiento (CIAT, 1991).

Durante el establecimiento es también de importancia producir el mayor número de brotes a partir de cada segmento sembrado *in vitro*, ya que éste puede tener más de una yema latente. Esto nos permite explotar el mayor potencial de la técnica, regenerando mayor cantidad de plantas desde la primera etapa y aumentando la eficiencia del sistema.

La brotación de yemas se da naturalmente en la planta por la influencia del contenido endógeno de hormonas de crecimiento. Estas se producen en diferentes lugares de la planta y actúan en cantidades mínimas para lograr su efecto. Para lograr la proliferación de brotes en micropropagación a partir de la yema presente, se hace necesario proveer, en el medio de crecimiento, compuestos que igualan el efecto de las hormonas. Estos compuestos se designan como reguladores de crecimiento.

En el cultivo de yemas axilares, los reguladores de crecimiento esenciales son las citoquininas y las auxinas. Según Pierik (1987), las citoquininas inducen la división celular por lo que se utilizan para estimular el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las auxinas producen la elongación celular y se utilizan a concentraciones bajas (George, 1996). Estas últimas se relacionan con la aparición de raíces adventicias, inhibiendo el desarrollo de yemas adventicias. Las citoquininas son esenciales para la proliferación de brotes.

Los cortes necesarios que se deben realizar en los tallos de rosa miniatura para la obtención de explantes hacen que los tejidos se tornen café y exuden compuestos fenólicos al medio (George, 1996). Este fenómeno se conoce como oxidación y es detrimental, ya que puede inhibir el crecimiento y puede provocar hasta la muerte de los tejidos afectados. Estos efectos son más severos durante los estados iniciales del cultivo, por lo que se hace necesario el manejo de la oxidación durante la etapa de establecimiento (George, 1996).

Se pueden tomar varios modos de acción para evitar la oxidación. El objetivo de todos es evitar que los compuestos fenólicos producidos interfieran con el desarrollo normal del brote. Como medidas preventivas se pueden utilizar antioxidantes, ya sea como componente integral dentro del medio de cultivo, o durante el proceso de preparación del explante previo a su siembra. También se puede modificar la composición del medio de cultivo añadiendo carbón activado, el cual tiene la capacidad de absorber compuesto exudados al medio de cultivo (George, 1993). La selección del método a usar va a depender de su eficiencia para producir, no sólo cantidad, sino que también calidad de brotes para iniciar exitosamente la siguiente etapa.

Teniendo estos parámetros en mente, los objetivos del presente estudio son:

● Objetivo general.-

Recomendar un protocolo para el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*.

Objetivos específicos.-

- Determinar un proceso de desinfección apropiado para reducir la contaminación *in vitro* de material vegetal de rosa miniatura traído del campo.
- Reducir la oxidación en el establecimiento del material vegetal.
- Obtener la brotación uniforme de las yemas sembradas, y una calidad apropiada de los brotes obtenidos para su posterior multiplicación *in vitro*.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 EL CULTIVO *IN VITRO*

Según CIAT (1991), el cultivo de tejidos *in vitro* comprende un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. Mientras que Pierik (1987) lo define como el cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles, de plantas, semillas, embriones, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos.

Ambas definiciones coinciden en su esencia, y hacen especial referencia al uso de un medio en el cual crecerá la porción de planta a sembrar, y a la necesidad de trabajar en condiciones asepticas. Basándose en estos conocimientos, podemos decir que los principios involucrados en el cultivo de tejidos son (Thorp, 1981):

- Aislamiento de una parte de la planta intacta.
- Proveer un ambiente apropiado en el que se pueda expresar todo el potencial intrínseco o inducido del explante, esto incluye proveer condiciones estrictamente controladas de ambiente y de nutrición.
- Proveer condiciones de estricta asepsia durante el proceso.

Este desarrollo de las plantas en el proceso *in vitro* involucra cinco etapas, las cuales son (Pierik, 1987):

- Etapa 0 – Se conoce como el estado preparativo de la planta madre, en el cual se hace un pre-tratamiento del material inicial, para asegurar que las plantas se mantengan libres de enfermedades. También se busca obtener material fisiológicamente mejor adaptado.
- Etapa I – La etapa de establecimiento en la que se realiza el aislamiento estéril de los explantes y se inicia su establecimiento *in vitro*. La condición más importante en esta etapa es el crecimiento y desarrollo sin contaminación, para así obtener un inicio seguro y confiable del cultivo.
- Etapa II – La multiplicación o proliferación de brotes, tratando de conseguir, hasta donde sea posible, la propagación del material sin perder su estabilidad genética.
- Etapa III – Involucra la elongación de tallos, la inducción y desarrollo de raíces, con el objeto de preparar las plantas para su posterior transferencia al suelo.
- Etapa IV – La transferencia a condiciones de invernadero y establecimiento de la plantación a condiciones *ex vitro*.

2.2 MICROPROPAGACION

De las técnicas de cultivo de tejidos, la más ampliamente utilizada es la propagación vegetativa *in vitro*, o micropropagación. De ésta, la técnica más utilizada en rosas es el estímulo de yemas axilares (George, 1996). Esta involucra el aislamiento de una yema, junto con una porción del tallo, para obtener un vástago a partir de la yema. Estos vástagos son posteriormente enraizados para su transferencia al suelo (Pierik, 1987).

Las condiciones *in vitro* estimulan el desarrollo de la yema axilar, permitiendo la formación de una planta por cada yema en la etapa de establecimiento (CIAT, 1991). La gran ventaja de esta técnica es que los individuos regenerados muestran una gran estabilidad genética (CIAT, 1991). Por esta razón es importante evitar la formación de callo, ya que de éste se regeneran plantas con diferentes grados de variación.

El establecimiento del cultivo en el laboratorio debe implicar la selección del mejor explante y su desinfección superficial. Se considera que se ha tenido éxito al establecer el cultivo cuando los explantes están libres de contaminantes microbiales obvios, y esto es seguido de algún tipo de crecimiento (George, 1993).

Los factores que más en cuenta se deben tener, por su influencia en el establecimiento de la micropropagación, son (CIAT, 1991):

- El estado fisiológico y la sanidad de la planta que dona el explante o planta madre,
- La edad fisiológica de los explantes y su posición en la planta madre.
- Los factores físicos involucrados en el desarrollo de las yemas, como temperatura y luz.
- El medio nutritivo, siendo de igual importancia su consistencia así como su composición química.

2.2.1 El explante

Según Pierik (1987), el explante se define como la porción de tallo escindido, u órgano tomado de la planta, para iniciar un cultivo. Para el establecimiento de cada cultivo se debe seleccionar el explante más apropiado. Esta selección se hace dependiendo de la disponibilidad de material, facilidad de manipulación, homogeneidad, ausencia de contaminantes endógenos en la medida que sea posible, y rápida respuesta *in vitro* (CIAT, 1991). En el caso de rosa miniatura, se utilizan yemas axilares, mismas que se encuentran presentes en las axilas de cada hoja (Marcelis-van Acker y Scholten, 1995) y presentan una vía rápida y segura para regenerar plantas *in vitro*.

Según George (1993), el mejor material para los explantes proviene de plantas madres sanas y vigorosas que se han mantenido en crecimiento activo sin ningún tipo de estrés. Estas condiciones aseguran explantes que responderán favorablemente a las condiciones *in vitro* a que sean sometidos. Las plantas madres que se utilicen, preferiblemente, deberán mantenerse en invernaderos. Pero en la práctica, esto muchas veces no es factible por lo que se hace necesario el uso de plantas que crecen en el campo. Hay que

considerar que el material que crece en el campo está sujeto a altas tasas de contaminación y a un ambiente variable (George, 1996).

El tamaño del explante a utilizar es también un factor a considerar. El crecimiento de los brotes aumenta a medida que aumenta la cantidad de tejido del tallo que se siembra (Marcelis-van Acker y Scholten, 1995). La limitante de esta declaración es que el tamaño del explante también influye en el grado de contaminación: a mayor tamaño del explante, mayor probabilidad de contaminación. Por lo que en rosas, Khosh-Khui y Sink (1982) recomiendan segmentos de 6 a 10 mm de largo como el tamaño más apropiado de explante.

2.2.2 Contaminación

Según Thorpe (1981), la exclusión rigurosa de microorganismos contaminantes es una característica esencial en el cultivo de tejidos. Según el CIAT (1991), la asociación explante-medio y las condiciones físicas en que se incuban los cultivos hacen un ambiente favorable para la proliferación de microorganismos.

Dada esta situación, el CIAT (1991) recomienda que para establecer cultivos asepticos es necesario trabajar en un ambiente adecuado, como en una cámara de flujo laminar. Así mismo, esterilizar los medios de cultivo, desinfectar superficialmente los explantes para liberarlos de bacterias y hongos exógenos y realizar los cultivos respetando ciertas normas de asepsia.

Para lograr la asepsia se deben esterilizar los medios de cultivo, los tubos de ensayo en los que se dispensa el medio, los instrumentos a usar para manipular los tejidos una vez desinfectados y el material de la planta. La esterilización de la cristalería, los instrumentos metálicos y el medio de cultivo se lleva a cabo con el uso de calor y presión (Thorpe, 1981), por lo que se recomienda el uso del autoclave.

El CIAT (1991) considera que los tejidos de las plantas intactas y sanas son asepticos internamente, y que la principal tarea de limpieza del material para explantes está limitada a la esterilización superficial. Esta desinfección debe permitir eliminar los microorganismos con el menor daño posible para los explantes (Dodds y Roberts, 1985), lo que se hace mediante métodos químicos. Para rosa miniatura la esterilización superficial de explantes puede hacerse directamente sin dañar las yemas, ya que éstas son lo suficientemente resistentes (George, 1993).

La esterilización superficial del material puede realizarse con una variedad de esterilizantes. Los de uso más común son: soluciones de hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) o de sodio (NaOCl), nitrato de plata (AgNO_3), cloro comercial, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y alcohol al 70%. Antes de la siembra, y a nivel de la cámara de flujo laminar, los esterilizantes deben ser removidos con enjuagues de agua bidestilada estéril (Thorpe, 1981).

Según George (1993), los mejores productos son los menos costosos y menos tóxicos para las plantas y las personas manipulándolos. Los de mayor uso contienen hipoclorito como ingrediente activo, que presenta la ventaja de que se remueve más fácil de las superficies después de la esterilización (CIAT, 1991). De los hipocloritos, el más utilizado es el hipoclorito de sodio por ser el más disponible en forma de cloros industriales (George, 1993).

El CIAT (1991) recomienda que la solución de hipoclorito de sodio, NaOCl, en concentraciones de 1-3% de ingrediente activo, sirve para la esterilización superficial de materiales de todo tipo, siempre y cuando no se produzcan lesiones debido a su acción blanqueadora. Este germicida deberá hacer el mejor contacto posible con el material vegetal, por lo que se recomienda utilizar unas gotas de agentes destensadores o "wetting agents" a las soluciones desinfectantes, como el Tween 20, Tween 80 o Tritón.

Para el caso particular de rosa miniatura, Kane (1988) recomienda que el material, una vez preparado para la siembra, sea lavado bajo el chorro de agua de la llave por quince minutos. Esto permite reducir los niveles de contaminantes superficiales y hace más vulnerable a los microorganismos para el tratamiento de desinfección (George, 1993). Luego se desinfecta por quince minutos en una solución desinfectante que contenga 20% (v/v) de cloro comercial y dos gotas de Tween 20 por cada 100 ml de solución. Una vez en la cámara se le deben hacer tres enjuagues con agua estéril bidestilada.

2.2.3 Medio nutritivo

Según Pierik (1987), el medio nutritivo es una mezcla de sustancias sobre o en las cuales pueden crecer células, tejidos u órganos, con o sin agente gelatinizador. Las sustancias necesarias para el cultivo *in vitro* son: agua, compuestos inorgánicos (macroelementos, microelementos y hierro) y compuestos orgánicos (vitaminas, aminoácidos, azúcar como fuente de carbono y reguladores de crecimiento, especialmente auxinas y citoquininas).

La combinación que se escoja de estas sustancias depende de muchos factores, como ser (Pierik, 1987):

- La especie que se está propagando.
- La edad de la planta madre.
- La edad del órgano que se siembra.
- El tipo de órgano que se cultiva.
- La vía de regeneración.
- La etapa de cultivo en el laboratorio.

El medio nutritivo más utilizado es el de Murashige y Skoog (MS) por su efecto positivo en la mayoría de las plantas, especialmente herbáceas (Pierik, 1987). George (1993) lo considera conveniente para el cultivo de yemas axilares y la proliferación de brotes. Se debe tener en cuenta que éste no siempre es la mejor opción para el crecimiento y desarrollo, ya que su contenido de sales es muy elevado. El medio desarrollado por

Lloyd y McCown, denominado "Woody Plant Medium" (WPM), resulta una mejor alternativa para especies leñosas sensibles a la salinidad (Pierik, 1987).

Según George (1993), el medio MS da un buen crecimiento y proliferación de brotes para rosas en las etapas I y II, aunque muchas veces se hace necesario modificar su contenido vitamínico y reducir las concentraciones de sales minerales. Anota también que el medio Lloyd y McCown hace posible una buena multiplicación de brotes.

Además de la formulación *per se*, el pH al que se ajusta el medio es también importante. Según Pierik (1987), el rango óptimo para el crecimiento *in vitro* de la mayoría de las especies es de 5.0-6.5, siendo el máximo alrededor de 6.0. Un aumento o disminución del pH en este rango, frena el crecimiento y desarrollo de los tejidos. Se debe considerar al ajustarlo, que en el proceso de autoclaveado del medio, éste sufre un descenso de 0.3-0.5 unidades (Pierik, 1987).

2.2.3.1 Azúcar. El azúcar se adiciona al medio como fuente de carbohidratos. Según Pierik (1987), el azúcar es un componente importante en cualquier medio nutritivo, y es esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, ya que los tejidos verdes bajo las condiciones *in vitro* no son suficientemente autótrofos.

La concentración y tipo de azúcar depende mucho del tipo y edad del material vegetal. En general, el crecimiento y desarrollo del material cultivado *in vitro* aumenta a medida que aumenta la concentración de azúcar, hasta llegar a un óptimo (Pierik, 1987). Según George (1993), la sucrosa, a una concentración de 30 g/l, es el azúcar más utilizado para el cultivo de yemas axilares.

Para la micropropagación de rosas se recomienda concentraciones hasta de 40 g/l, ya que se reduce la hiperhidratación de tejidos, misma que aumenta a medida se reduce la concentración de azúcar en el medio (George, 1996).

Marcelis-van Acker y Scholten (1995), han determinado que la glucosa da mejor crecimiento que la sucrosa en rosas. El autoclaveado produce la ruptura de sucrosa (Pierik, 1987), que se descompone produciendo fructosa y glucosa. En el caso de glucosa, después del autoclaveado, puede recuperarse completamente.

2.2.3.2 Nutrición mineral. Según Pierik (1987), después de los azúcares, los minerales constituyen el grupo más importante de sustancias nutritivas en el medio de cultivo. La especie con la que se trabaja va a determinar la mezcla de macro y micro-sales a utilizar. En la mayoría de los casos, el medio MS aporta la mezcla apropiada para el establecimiento y desarrollo de las plantas *in vitro*.

Los nutrientes inorgánicos son aquellos requeridos normalmente por la planta; se dividen en macroelementos y microelementos, según la cantidad requerida *in vitro* por la planta. Los macroelementos son esenciales para la planta y son requeridos en concentraciones

milimolares; éstos son: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, azufre y magnesio. Los microelementos son nutrientes esenciales requeridos en concentraciones micromolares, y son: manganeso, zinc, boro, cobre, cobalto, cloro, iodo y molibdeno. También se suplementa el hierro en cantidades intermedias, asociado a un quelato etilendiaminotetraacetato (EDTA) que lo hace disponible a la planta.

2.2.3.3 Reguladores de crecimiento. Según Pierik (1987), se conoce como reguladores de crecimiento al conjunto de productos sintéticos y hormonas naturales responsables de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza. Así mismo, los reguladores de crecimiento determinan el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta, por ser responsables de la división celular y el crecimiento de las células.

El tipo de regulador que se escoja y su concentración dependen del tipo de crecimiento que se requiera, de los niveles endógenos naturales de hormonas en la planta, de la capacidad de los tejidos de sintetizarlos y de la interacción entre los productos sintéticos aplicados a los medios (George, 1993).

Los efectos de los reguladores de crecimiento no son absolutos y específicos. La respuesta en cultivo de tejidos varía de acuerdo a las condiciones culturales, el tipo de explante que se utiliza y el genotipo de la planta (George, 1993). El crecimiento y la morfogénesis están regulados por la interacción y balance entre los reguladores, siendo los de uso más común las auxinas y citoquininas.

Las auxinas, en conjunto con las citoquininas, controlan procesos como el crecimiento celular, la elongación de células y la morfogénesis (George, 1993). Según Pierik (1987), las auxinas también producen la formación de raíces adventicias y la inhibición de la formación de vástagos axilares y adventicios. Las auxinas de uso más común son el ácido indoleacético (AIA), el ácido indolebutírico (AIB), el ácido naftalenoacético (ANA) y el 2,4-D. Si éstas se utilizan a bajas concentraciones, predomina la formación de raíces adventicias; con concentraciones más altas, se da la formación de callo en lugar de raíces (Pierik, 1987).

La auxina más común para el cultivo de yemas axilares es el AIA, la cual usada con otros reguladores, induce la morfogénesis directa de brotes. Esta auxina se requiere para promover el crecimiento inicial de las yemas (George, 1993). En rosas se provee una concentración baja de esta auxina para inducir la proliferación de brotes (George, 1996). Hasegawa (1979) encontró que los niveles bajos de AIA estimulan el mayor número de brotes adventicios en rosas. Kyte (1987) la recomienda a un nivel de 0.1 mg/l para el establecimiento de rosa miniarura.

Las citoquininas estimulan la división celular, por lo que se utilizan para estimular el crecimiento y el desarrollo (Pierik, 1987). En el cultivo de yemas adventicias se agregan porque reducen la dominancia apical permitiendo que las yemas laterales salgan de dormancia (George, 1993), promoviendo así la formación de vástagos axilares. La

cantidad de brotes formados de yemas en rosa se regula principalmente con la adición de citoquininas (Hasegawa, 1980).

La citoquinina se supe *in vivo* por las raíces (Marcelis-van Acker y Scholten, 1995) por lo que se hace necesario proveerla *in vitro*. Muchos de los tejidos que se cultivan no son capaces de sintetizar la suficiente cantidad para sostener el crecimiento (George, 1993). Las citoquininas más comunes son la kinerina, benziladenina o benzilaminopurina (BA ó BAP) y la iso-pentiladenina (2iP). La más apropiada para el cultivo *in vitro* de rosas es el BAP (Marcelis-van Acker y Scholten, 1995).

Proveer las citoquininas en concentraciones altas induce la formación de vástagos adventicios, a la vez que inhibe la formación de raíces (Pierik, 1987); sin embargo, Marcelis-van Acker y Scholten (1995) demostraron que concentraciones muy altas reducen el peso y el largo de los brotes principales. El establecimiento de rosa *in vitro* se logra en un medio con bajos niveles de BAP para lograr la multiplicación de las yemas (Bressan *et al.*, 1982). George (1996) recomienda una concentración de 0.9 mg/l para el establecimiento, mientras que Kane (1988) recomienda 0.5 mg/l.

Lo más importante en el cultivo de tejidos es que el medio contenga la relación correcta de reguladores para cada especie que se cultiva y para cada etapa del cultivo (Kyte, 1987). Según George (1993), muchos aspectos de la diferenciación celular y organogénesis en los tejidos se ha encontrado que son controlados por la interacción entre la concentración de citoquininas y auxinas. Para la formación de brotes se requiere un balance entre estos dos tipos de reguladores de crecimiento; su interacción es muy compleja y más de una combinación puede producir los resultados óptimos (George, 1993). Por lo general, una relación alta de citoquininas a auxinas promueve la formación de brotes, mientras que una baja favorece la diferenciación de raíces (Pierik, 1987).

2.2.3.4 Otros compuestos. Además de los compuestos ya mencionados, muchas veces es necesario agregar otro tipo de compuestos como vitaminas y aminoácidos. Estos últimos se agregan muchas veces como fuente de nitrógeno orgánico. Algunas vitaminas pueden ser limitantes cuando las plantas se cultivan *in vitro* (Thorpe, 1981), como por ejemplo la tiamina para la cual hay un requerimiento absoluto. Esta funciona en una coenzima para asistir en el ciclo de Krebs (Kyte, 1987).

Aunque no se conoce exactamente la función de las vitaminas, se ha encontrado que el crecimiento se mejora agregando al medio vitaminas como: ácido nicotínico, piridoxina, biotina, pantotenato, ácido ascórbico, inositol y riboflavina. De éstas se ha encontrado que el inositol estimula la división celular (CIAT, 1991).

2.2.3.5 Agar. La presentación física y consistencia del medio es igual de importante que la composición química. El medio debe proveer el sostén físico necesario dependiendo del cultivo a realizar. La propagación de rosa miniatura por medio de yemas axilares requiere de un medio sólido, lo suficientemente consistente para soportar el explante, por

lo que se usa agar. Este es un producto de origen vegetal (algas marinas) que se usa para solidificar medios (Pierik, 1987). El agar disuelto en el medio forma un gel capaz de retener el agua y absorber compuestos.

El agar es un compuesto bastante costoso, por lo que se utilizan agentes gelificantes con muchas presentaciones comerciales. Estas tienen mucha influencia en el cultivo, causadas probablemente por las diferentes impurezas que contengan, la rigidez del gel que producen, la variante disponibilidad de agua, iones y reguladores que tengan (Podwyszynska y Olszewski, 1995). En el caso de las rosas, son muy sensibles al tipo de agente gelificante que se utilice. La explicación más probable es que afectan la disponibilidad de nutrientes (Marcelis-van Acker y Scholten, 1995). Podwyszynska y Olszewski (1995) recomiendan el Agargel (Sigma) para el cultivo *in vitro* de rosa.

El Agargel (Sigma) es una mezcla de agar y Phytigel (Sigma) desarrollado para controlar la vitrificación. Produce un gel semi-transparente y debe ser usado en concentraciones de 3.5-5 g/l. Este presenta una alternativa más económica que el agar.

2.2.4 El cuarto de crecimiento

Para el cultivo *in vitro* se hace necesario disponer de una cámara de cultivo en la que se pueda hacer un control ambiental, misma que se conoce como cámara de incubación o cuarto de crecimiento (Pierik, 1987). Esta cámara debe proporcionar un buen control de la temperatura (20-28°C), de la iluminación (1000-5000 lux) y de la humedad relativa (70-80%). Todos estos factores siendo determinados por la especie a propagar. Un aspecto crítico es propiciar una buena distribución de aire para evitar zonas de recalentamiento (CIAT, 1991).

Para el cultivo *in vitro* de rosa, Kyte (1987) recomienda una temperatura de 25°C, una iluminación de 100-300 pies candelas, proporcionada por tubos fluorescentes de tipo blanco frío y un fotoperiodo 16 horas luz.

2.2.5 Problemas biológicos de cultivo

2.2.5.1 Oxidación. La rosa miniatura debe ser cortada previo a su siembra, lo cual trae como consecuencia uno de los problemas más comunes de la propagación *in vitro*, que es la oxidación de tejidos. La oxidación ocurre a través de la acción de enzimas oxidativas que contienen cobre, las cuales son liberadas, sintetizadas o presentes con un sustrato apropiado y en condiciones oxidativas cuando los tejidos son lastimados o senescentes (George, 1996).

La oxidación produce el oscurecimiento y eventualmente la muerte del explante (CIAT, 1991). Esta se manifiesta como un oscurecimiento en el medio. La naturaleza de esta sustancia es todavía incierta, pero se sabe que usualmente son combinaciones de sustancias fenólicas complejas (George, 1996).

La oxidación en las primeras etapas del cultivo interfiere con el desarrollo adecuado del explante, por lo que es necesario prevenirla. Hay muchas posibilidades de prevención, como (George, 1996):

- Minimizar el daño causado al explante,
 - Remover los compuestos fenólicos producidos mediante el uso de carbón activado • • transferencias frecuentes a un medio fresco
 - Modificar el ambiente físico mediante el cultivo en la obscuridad o a baja luminosidad.
 - Modificar el potencial reductor de los tejidos con el uso de antioxidantes.
 - Alterar la composición del medio y el tipo de reguladores de crecimiento que se usen.
- La alternativa que se escoja dependerá de su efectividad en el explante con que se trabaje y la facilidad de implementación.

Según CIAT (1991), es útil usar sustancias antioxidantes en el medio, como ácido ascórbico, ácido cítrico, cisteína, polivinilpirrolidone (PVP), o durante la preparación del explante. Igualmente el CIAT (1991) recomienda incubar cultivos en la obscuridad o a bajas intensidades de luz. Los antioxidantes se definen como donadores de electrones que inhiben la oxidación de substratos lábiles (George, 1996). Por tradición, el antioxidante más utilizado ha sido el ácido ascórbico, que se considera benéfico debido a su capacidad para actuar como agente reductor.

Una solución de ácido ascórbico y ácido cítrico es comúnmente usada para enjuagues de explantes recién contados. El ácido cítrico actúa como un agente quelante, secuestrando iones metálicos que se requieren para activar las enzimas oxidativas (George, 1996). Para rosa se ha encontrado efectivo el enjuague con PVP antes de la siembra de los explantes (George, 1996).

El ácido ascórbico y el ácido cítrico también se utilizan en el medio de cultivo, pero el ácido ascórbico es termolábil por lo que su efecto es limitado y su efecto sobre los explantes debe ser inmediato. El ácido cítrico actúa como buffer y como nutrimento. La combinación de ambos compuestos se ha utilizado ampliamente para reducir la oxidación (George, 1996). En rosa se recomienda la adición de 50 mg/l de ácido ascórbico y 150 mg/l de PVP al medio de cultivo (George, 1996).

También se puede agregar carbón activado al medio de cultivo como medida preventiva para reducir la oxidación. Según George (1996), las ventajas de usar carbón activado depende del cultivo, pero en general se debe a la absorción, por parte del carbón activado, de los compuestos secretados de los tejidos o presentes en el agar que inhiben el crecimiento. La absorción de compuestos presentes en el medio se da particularmente cuando los explantes son transferidos por primera vez al medio.

Según Mensuali-Sodi *et al.* (1993), los efectos positivos del carbón activado han sido atribuidos a varios factores, como: el oscurecimiento del medio, la absorción de los reguladores de crecimiento, la remoción de compuestos inhibitorios, la absorción de impurezas del agar y la absorción de fenoles producidos por los tejidos. Estos autores

encontraron que la oxidación severa en el cultivo de *Anemone* se previno agregando carbón activado al medio y que se dieron plantas de buena calidad.

Según George (1996), la oxidación es menos severa en un medio diluido que en un medio alto en sales como el medio MS. Algunos investigadores han encontrado que el medio Lloyd y McCown ha prevenido la oxidación, pero la razón no es obvia (George, 1996). Otra alternativa es el uso de medios líquidos, ya que en éstos se puede evitar la acumulación de compuestos fenólicos en la base del explante.

2.2.5.2 Vitrificación. Otro problema que se puede presentar en el cultivo de tejidos es la vitrificación. Esta se conoce también como hiperhidratación y esta asociada con altos niveles de citoquininas y con el uso de material joven. La vitrificación es fundamentalmente resultado de un exceso de humedad en el tubo de crecimiento, de una escasa concentración de agar o la utilización de un agente gelatinizador no apropiado (Pierik, 1987).

La vitrificación puede prevenirse utilizando un medio de cultivo de potencial osmótico apropiado. Esto se logra manejando los niveles de azúcar en el medio de cultivo. Según George (1996), una concentración de 20 mg/l de sucrosa en el medio de cultivo provoca una mayor incidencia de vitrificación que una de 30 mg/l. Otros compuestos que se pueden manipular para reducir el problema de vitrificación son las citoquininas y el tipo de agar que se utilice.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 LOCALIZACIÓN

El ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación de El Zamorano, Departamento de Francisco Morazán, Honduras.

3.2 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal que se utilizó fueron segmentos de tallos de rosa miniatura con una yema axilar presente (Anexo 1). Este se obtuvo de dos plantas del edificio de Agronomía de El Zamorano y de una planta del invernadero del laboratorio. Las tres plantas fueron sometidas a aplicaciones semanales de Ridomil CT y Agrymicin, a manera de curativos y preventivos. Además se aplicó semanalmente el fertilizante foliar Baytolan para asegurar tener material vigoroso.

Una semana antes de la siembra se midió el grosor debajo de las yemas de los varios tallos que poseían las plantas, para así determinar la cantidad de material disponible.

3.3 EL EXPLANTE

De acuerdo a las mediciones hechas, se determinó que el grosor promedio a utilizar para la siembra sería de 2 mm. La toma de material de la planta madre se llevó a cabo temprano en horas de la mañana, cortando los tallos con tijeras de podar siempre encima de una yema para así asegurar la brotación adecuada de la parte podada. Antes del corte, se midió el grosor del tallo debajo de la yema más cercana al corte para determinar que su grosor correspondía al grosor previamente establecido. Inmediatamente después de la poda, se eliminaron todas las hojas de la porción del tallo cortado y cualquier otro material vegetal, para sólo dejar el tallo con las yemas expuestas. Estos tallos se transportaron al laboratorio en bolsas de plástico conteniendo una toalla de papel humedecida. Cada mañana se seleccionó y se tomó la cantidad de material necesaria para la siembra del día; lo sobrante se descartaba.

Una vez en el laboratorio, se prepararon porciones de tallo de 1.5 cm de largo cada uno, con una yema al centro de cada segmento. Los cortes se hicieron con un bisturí limpio, sosteniendo los tallos con una pinza limpia. Después de realizar todos los cortes se midió el grosor debajo de cada yema para asegurar los 2mm. Las yemas cortadas se iban colocando en un beaker limpio.

3.4 DESINFECCION

3.4.1 Pruebas preliminares

Por la cantidad de material requerido para la siembra de este ensayo, se hizo necesario, al principio de este trabajo, recurrir a un vivero externo para obtener el material vegetal inicial. Las plantas provenientes del campo, muchas veces traen un nivel de contaminación bastante elevado, por lo que se hizo una siembra inicial siguiendo el protocolo de esterilización superficial previamente establecido para el laboratorio y que se describe más adelante. En esta primera prueba, todos los tubos se contaminaron.

Debido al alto grado de contaminación, se procedió a aplicar las plantas madres semanalmente con una mezcla de Ridomil CT (4g/l) y Agrymicin (3 g/l), además del Bayfolan (2.5 ml/l). A las 3 semanas de aplicación se realizó otra prueba de contaminación.

En esta segunda prueba se probaron diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio a diferentes tiempos de exposición. Los tratamientos y los resultados se muestran en el Cuadro 1. Los dos tipos de medio que se probaron fueron: el primero, el medio que se describe más adelante en el Cuadro 2 como medio A (medio A); el segundo (medio B), llevaba un antibiótico, gontamicina, incluido a razón de 50 mg/l que se esterilizo por filtración y se agregó al medio de cultivo previamente esterilizado en el autoclave. Esto se hizo a nivel de la cámara de flujo laminar. En cada tratamiento se sembraron 10 tubos de ensayo.

Cuadro 1. Pre-ensayo de manejo de contaminación en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Tiempo de exposición (min)	Medio	Concentración de Hipoclorito de Sodio ¹ (% ingrediente activo) ¹				
		0	0.5	1.0	1.5	2.0
		Número de tubos contaminados ²				
0	A	9	9	9	9	9
	B	9	9	9	8	9
10	A	9	9	9	9	9
	B	9	8	8	9	7
20	A	9	9	9	7	7
	B	9	8	6	6	7
30	A	9	8	8	8	7
	B	9	7	7	8	7

¹Se utilizó una formulación comercial al 5.25% de ingrediente activo.

²De 10 tubos sembrados por tratamiento.

Como se puede apreciar en los resultados obtenidos de este pre-ensayo, el nivel de contaminación de las plantas traídas del campo no se puede controlar con ninguno de los

tratamientos aplicados, por lo que se tomó la decisión de trabajar con el material disponible para el laboratorio en el invernadero y los jardines del edificio de agronomía. Utilizando este material, se procedió entonces a hacer una tercera prueba preliminar de desinfección, utilizando el medio A ya descrito de las pruebas anteriores, y el procedimiento de desinfección normalmente utilizado por el laboratorio.

Debido al alto grado de contaminación que se presentó en dos de las plantas provenientes del exterior, se probó la desinfección química sumergiendo los explantes en una mezcla de Benlate y Agrymicin, a razón de 3 g/l cada uno, por media, una y dos horas con agitación constante como tratamientos previos a la siembra. Esta cuarta prueba no dio buenos resultados ya que no se redujo considerablemente la contaminación. Además, la exposición prolongada a estos químicos de una o dos horas provocó la muerte de las yemas, por lo que se decidió trabajar con el método previamente establecido en el laboratorio, sin el uso de antibiótico en el medio de cultivo y sin utilizar enjuagues en solución fungicida-bactericida previo a la siembra.

3.4.2 Esterilización superficial

Los explantes se colocaron en un beaker que se cubrió con una gasa estéril, misma que se ajustó a la boca del beaker con una banda elástica. El beaker se colocó bajo el chorro de agua de la llave por quince minutos para realizar la limpieza superficial. Mientras ~~esta~~ se realizaba, se procedió a la limpieza de la cámara de flujo laminar, rociando toda la superficie con alcohol al 70% y limpiando con una toalla de papel.

Una vez finalizada la limpieza superficial de los explantes se drenó del beaker el agua de la llave, y se agregó agua bidestilada en una cantidad suficiente para cubrir todos los explantes; el beaker se dejó tapado con una gasa. Para cada tanda de siembra se extrajo la cantidad de explantes requeridos para pasar inmediatamente a la desinfección química superficial.

Para la desinfección química superficial, los explantes se colocaron en una solución desinfectante de hipoclorito de sodio al 1.05% ingrediente activo (I.A.), conteniendo dos gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución. El hipoclorito de sodio se suplió en forma de cloro comercial Magna Blanca (5.25% I.A.). Los explantes se mantuvieron en esta solución durante 10 minutos con agitación constante.

3.5 MEDIO NUTRITIVO

El medio nutritivo utilizado consistió en una modificación del medio original de Minashige & Skoog (MS) con la adición de glicina. Los macroelementos se suplieron $\frac{1}{2}$ MS, porque en su concentración original puede ser muy fuerte, provocando oxidación (George, 1996). Se prepararon tres tipos de medio, variando agentes que pueden ser útiles para combatir la oxidación. La composición final de los medios se muestra en el Cuadro 2. El pH se ajustó a 5.7.

Cuadro 2. Composición de los medios nutritivos para control de oxidación en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Componente	Medio A	Medio B	Medio C
	mg/l		
Macroelementos (1/2 MS)			
Nitrato de amonio (NH_4NO_3)	825	825	825
Nitrato de potasio (KNO_3)	950	950	950
Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	220	220	220
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	185	185	185
Fosfato potásico (KH_2PO_4)	85	85	85
Microelementos (MS)			
Acido bórico (H_3BO_3)	6.2	6.2	6.2
Sulfato de manganeso, monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	16.9	16.9	16.9
Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	8.6	8.6	8.6
Yoduro de potasio (KI)	0.83	0.83	0.83
Molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.25	0.25	0.25
Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.025	0.025	0.025
Cloruro cobáltico ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.025	0.025	0.025
FeNaEDTA	50.0	50.0	50.0
Vitaminas WPM			
Tiamina HCl	1.0	1.0	1.0
Acido nicotínico	0.5	0.5	0.5
Piridoxina	0.5	0.5	0.5
Alcoholes de azúcar			
Inositol	100	100	100
Aminoácido			
Glicina	2	2	2
Azúcar			
Glucosa	40000	40000	40000
Antioxidantes			
Acido cítrico	-	50	-
Acido ascórbico	-	50	-
Carbón activado	-	-	2500
Agargel	5000	5000	5000
pH = 5.7			

Fuente: Kyte (1987), adaptado por el autor.

Con cada medio se probaron cinco concentraciones de la citoquinina bencil amino purina (BAP) de 0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/l. En combinación con éstas, se probaron también 3 concentraciones de la auxina ácido indoleacético (AIA) de 0, 0.1 y 0.2 mg/l (Cuadro 3).

Cuadro 3. Combinaciones de concentraciones (mg/l) de BAP y AIA para el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

AIA	BAP				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
0	1 ¹	4	7	10	13
0.1	2	5	8	11	14
0.2	3	6	9	12	15

¹Número de tratamiento

3.5.1 Preparación del medio.

Para la preparación del medio se utilizó una solución madre de macronutrientes MS concentrada 10 veces (50 ml por litro de medio de cultivo), una solución madre de micronutrientes MS concentrada 1000 veces (1 ml por litro de medio de cultivo) y una solución madre de hierro (FeNaEDTA a 50 mg/l) concentrada 200 veces (5ml por litro de medio de cultivo). Estas soluciones se agregaron de una en una a un beaker que contenía agua bidestilada y se mantuvo en agitación con el uso de un plato agitador. Los compuestos orgánicos se prepararon en soluciones madres diluidas de 1:1 (1 ml=1mg de producto) y se agregaron de uno a uno a la mezcla.

En el caso del medio A, luego se aforó a un volumen de 3 litros y se ajustó el pH a 5.7 con el uso de HCl y KOH. Se dividió en 15 partes iguales, de 200 ml cada una, para agregarle las diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento según el Cuadro 2. Seguidamente, se agregó el Agargel a cada uno de los 15 medios, y se calentaron para que éste se disolviera. Una vez disuelto, se dispensaron en tubos de ensayo de 25x150 mm a razón de 10 ml por tubo. Los tubos se identificaron previamente con un número y se taparon con tapones de plástico claro. Se esterilizaron en el autoclave por veinte minutos a una presión de 15 psi y una temperatura de 120°C.

Al medio B, después de agregarle los compuestos orgánicos, se le agregó el ácido cítrico y el ácido ascórbico. Luego se aforó a un volumen de 3 litros, se le ajustó el pH a 5.7 y se realizó el mismo procedimiento antes descrito para el medio A.

El medio C se aforó a un volumen de 3 litros, se ajustó el pH a 5.7 y se dividió también en 15 partes iguales. A cada una de estas partes, después de agregar los reguladores de crecimiento especificados, se les agregó el carbón activado y el Agargel, y se siguió el procedimiento ya descrito.

El producto final fueron 45 tratamientos con 20 tubos de ensayo por tratamiento.

3.6 CRISTALERIA E INSTRUMENTOS

Toda la cristalería e instrumentos se lavó con detergente, se enjuagó con agua de la llave y luego se enjuagó con agua bidestilada. La cristalería se secó a una temperatura constante de 120°C en un horno por cuatro horas. Los instrumentos se secaron al aire. Toda la cristalería e instrumentos que se utilizaron en la cámara de flujo laminar, como platos petri, pinzas y mangos para bisturí, se forraron con papel aluminio y después con papel traza. Esos paquetes se esterilizaron en el autoclave por 20 minutos a una presión de 15 psi y temperatura de 120°C.

3.7 SIEMBRA

Después de la desinfección química, los explantes se llevaron a la cámara de flujo laminar donde se decantó la solución desinfectante en un beaker. Los explantes se enjuagaron tres veces con agua bidestilada estéril; cada enjuague tuvo una duración de cinco minutos. Luego los explantes se extrajeron del enjuague final con el uso de una pinza larga previamente esterilizada y se colocaron en un plato petri. A cada explante se le cortó los extremos dañados con el hipoclorito de sodio, haciendo un corte recto con el bisturí en el extremo proximal y uno biselado en el extremo distal, quedando un tamaño final de explante de 0.7-0.8 mm. Inmediatamente los explantes se pasaron a una solución antioxidante preparada con 150 mg/l de ácido cítrico y 100 mg/l de ácido ascórbico en la cual se dejaron sumergidos durante 10 minutos.

De la solución antioxidante se pasaron a un plato petri previamente esterilizado. Con el uso de una pinza larga, se tomaba cada explante para sembrar en cada tubo de ensayo teniendo el medio correspondiente. En cada tanda de explantes preparados se sembraron los 45 explantes correspondientes a cada tratamiento. Al momento de la siembra se aseguraba la polaridad de los explantes sembrándolos en posición vertical de manera que el extremo proximal de corte recto quedará en contacto con el medio de cultivo. Así mismo, al momento de introducir el explante en el medio, se aseguró que la yema estuviera en contacto directo con el medio. Cada vez que se abría un tubo y antes de taparlo, la boca se flameaba con el uso de un mechero de alcohol. Una vez terminada la siembra, los tubos se sellaron con Parafilm, se marcaron con la fecha respectiva y se pasaron al cuarto de crecimiento.

Los instrumentos utilizados para la siembra, pinza larga, pinza pequeña y mango con bisturí, mientras no se estaban usando se mantenían en un frasco con 70% de alcohol. Antes de cada uso se flameaban en el mechero y se enfriaban sumergiéndolos en agua fría bidestilada estéril.

3.8 CUARTO DE CRECIMIENTO

Los 900 tubos de ensayo se mantuvieron en el cuarto de crecimiento, que se mantiene a una temperatura constante de 23°C-25°C, una irradiancia de 36 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ y un

fotoperiodo de 16 horas luz, utilizando tubos fluorescentes del tipo blanco frío para tal fin. La estantería es de madera y los tubos de ensayo se ubicaron a 30 cm de la fuente de luz.

3.9 VARIABLES ESTUDIADAS

Los tubos de ensayo se comenzaron a revisar tres días después de la siembra. Los datos finales se tomaron 5 semanas después de la siembra. Las variables que se estudiaron fueron las siguientes:

- Días a brotación - la yema se considera brotada cuando ésta desarrolla una pequeña protuberancia (Anexo 2).
- Días a apertura de lamina foliar - la lamina foliar se considera abierta cuando todos los folíolos de la hoja compuesta estuvieran totalmente abiertos (Anexo 3).
- Diferencia entre días de apertura de lamina foliar y días a brotación.
- Número de folíolos que se abrieron, al abrir la lamina foliar.
- Vigor de los brotes (VB) - se hizo en base a una escala de 1-3, siendo 3 los brotes con mayor vigor y 1 los de menor vigor. Las categorías se ilustran en el Anexo 4. El vigor se evaluó dos semanas después de la siembra y al final.
- Contaminación (C) - los tubos de ensayo que mostraban algún tipo de contaminación se desechaban y se clasificaba el grado de contaminación en una escala de 1-5. Las categorías se ilustran en el Anexo 5.
- Oxidación (O) - los tubos que mostraron un exudado café se clasificaban en una escala de 1-3, siendo el grado 3 el grado de mayor oxidación y el grado 1 ningún indicio de oxidación. Las categorías se ilustran en el Anexo 6. La oxidación se evaluó dos semanas después de la siembra y al final.
- Necrosis (N) - todo tallo que mostrara tejido muerto se le asignaba una escala de 1-3, siendo 3 el grado de mayor necrosis y el 1, ningún indicio de necrosis. Las categorías se muestran en el Anexo 7. También esta variable se evaluó dos semanas después de la siembra y al final.
- Formación de callo - se determinó si se presentó o no callo en los explantes (Anexo 8).
- Vitricación - se determinó si se presentó o no hiperhidratación de tejidos de los explantes (Anexo 9).
- Número de brotes - se contó el número de brotes presentes en la brotación de la yema. Para el análisis estadístico, se ajustó igualando todos los brotes a una calidad 3, siendo los de calidad 2 equivalentes a 0.5 brotes y los de calidad 1, a 0.3.
- Largo de los brotes - al momento de la toma final de datos, cada brote se extrajo del tubo y se midió en milímetros el largo del brote principal.
- Peso de los brotes - al extraer los brotes se cortaban al ras del tallo y se pesó todo el brote en gramos.
- Calidad de los brotes - Se juzgó la calidad en base a una escala de 0-3, siendo 3 la mejor calidad y el 0 ninguna producción de brote.

3.10 ANALISIS ESTADÍSTICO

Los tratamientos se ordenaron en un arreglo factorial de $3 \times 5 \times 3$ (medio \times BAP \times AJA) en un diseño completo al azar no ortogonal o desbalanceado. Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico "Statistical Analysis System" (SAS®) versión 6.2, por medio de un análisis de varianza.

Para comparar los tratamientos, se realizó una transformación de los datos obtenidos. La transformación a usar se determinó haciendo una relación entre la varianza y la media de cada variable. Las relaciones mayores que uno, se transformaron usando arcoseno. Las relaciones menores que uno se transformaron con raíz cuadrada más raíz cuadrada más uno, por tener medias menores de 2 (Zar, 1984).

El análisis de varianza se realizó para las variables transformadas y no transformadas, para determinar si la transformación tuvo el efecto deseado aumentando la significancia y ajuste del modelo.

La separación de medias se hizo para todas aquellas variables dependientes cuyo modelo tuviera una significancia menor o igual de 0.1 y un R^2 mayor de 0.2. Todas las variables independientes que tuvieran un $P(F)$ menor de 0.1 se compararon usando la diferencia mínima significativa.

Las variables no paramétricas, como ser presencia de callo y vitrificación, se analizaron usando la prueba chi-cuadrado. Las variables independientes analizadas en cada caso fueron aquellas que la literatura mencionaba como influyentes en este aspecto, como el nivel de reguladores de crecimiento utilizado y la interacción de éstos con el medio de crecimiento.

3.11 ANALISIS ECONOMICO

El análisis hecho fue sólo para los medios, para así determinar el medio menos costoso para futuros ensayos. Se determinó el costo por tratamiento tomando en cuenta los costos comunes y los diferenciales, obteniendo a partir de éste, el costo por unidad de producto.

Los costos de los tratamientos se evaluaron estadísticamente con un análisis de varianza y luego una separación de medias, para así determinar el menor costo y su significancia estadística utilizando la diferencia mínima significativa para la separación de medias.

Se obtuvieron los costos promedios por brotes producidos y el promedio de brotes estándares producidos. Con esta información, se hizo un análisis de costos mínimos y marginales para determinar el incremento de precio por brote producido.

3.12 ESQUEMA GENERAL DE INVESTIGACIÓN.

En la Figura 1 se muestra el esquema general seguido durante la investigación.

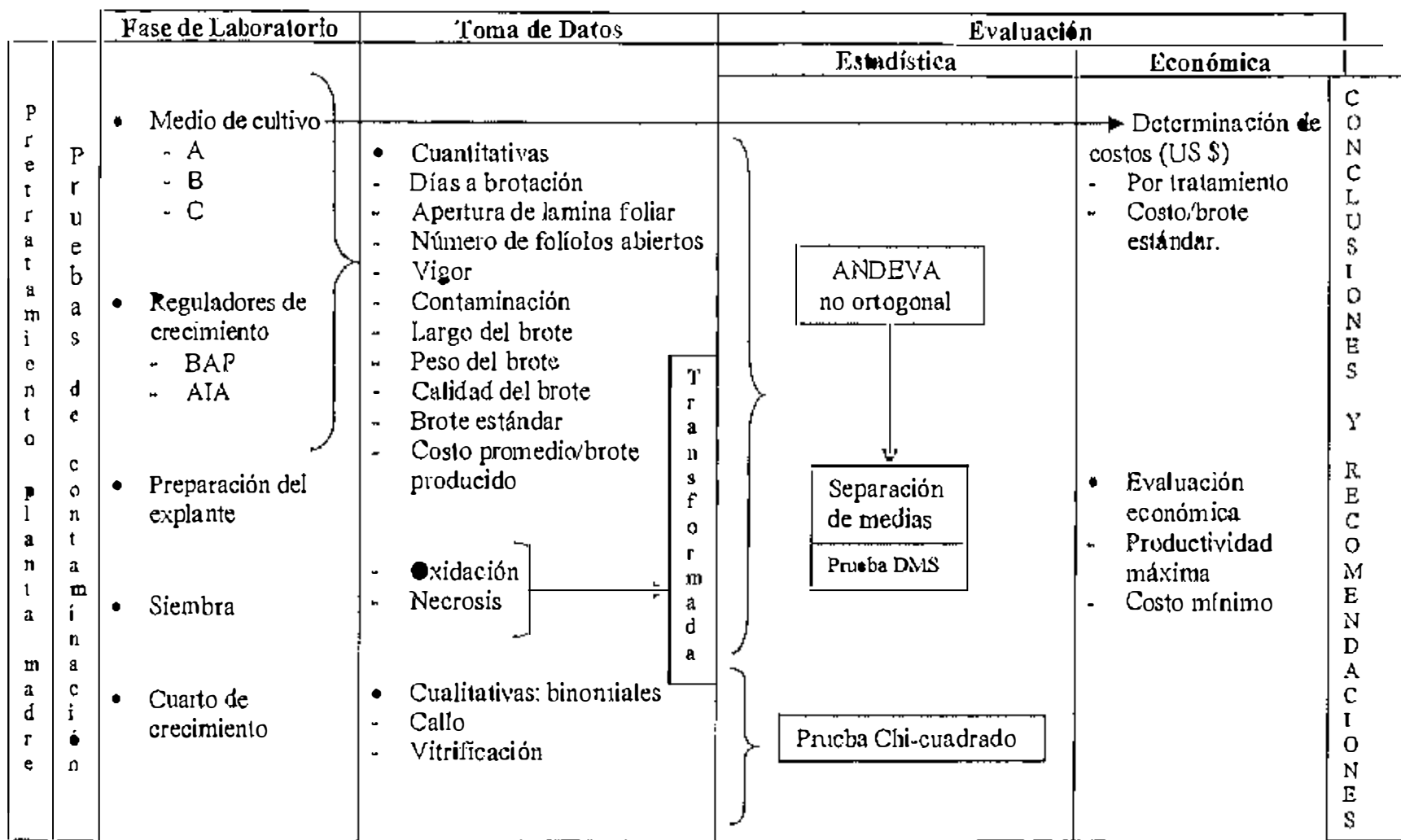


Figura 1. Esquema general de investigación para el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 RESPUESTA FISIOLÓGICA

Los resultados del análisis de varianza (Anexo 10) mostraron que las variables dependientes: días a brotación, contaminación, largo y calidad no fueron estadísticamente significativas. El efecto sobre éstas variables no fue dado por el tipo de medio de cultivo, los cinco niveles de bencilaminopuina (BAP), los tres niveles de ácido indoleacético (AIA), ni las respectivas interacciones entre estos factores.

La respuesta de las variables dependientes: apertura de lamina foliar, la diferencia entre apertura de lamina foliar y días a brotación, el número de hojas al momento de la apertura foliar, el vigor y el número de brotes producidos, no fueron suficientemente determinadas por las tres variables independientes antes mencionadas.

Todas estas variables dependientes describen el desarrollo del brote. Hubieron otros factores no controlados que influyeron más sobre la respuesta de éstas variables. Uno de éstos pudo ser el material vegetal utilizado. Según Pienik (1987), el material vegetal por sí mismo puede influir en el crecimiento y desarrollo de los tejidos *in vitro*. La influencia que éste ejerce se debe al genotipo, la edad de la planta, la edad del órgano, el estado fisiológico del órgano, el estado sanitario de la planta y las condiciones de crecimiento.

En este ensayo, los factores que más pudieron influir sobre la baja determinación de las respuestas, fueron el genotipo, el estado sanitario de la planta y las condiciones de crecimiento. Esto se debió a que se asumió que las plantas usadas tenían un genotipo uniforme porque las tres producen flores rosadas, determinando que son de un mismo cultivar. Además, dos de estas plantas se encuentran al aire libre y una bajo invernadero, lo que modifica su ambiente de crecimiento y los niveles de contaminación endógena.

George (1996) anota que la edad de las yemas de rosa y su posición dentro de la planta determina que tan exitoso es el establecimiento del cultivo *in vitro*. Además Bressan *et al.* (1982), demostraron que la posición nodal de las yemas axilares de *Rosa hybrida* afectan marcadamente el crecimiento y el desarrollo de los brotes en el cultivo *in vitro*.

4.1.1. Oxidación

El grado de oxidación que se presentó en el establecimiento del cultivo se debió al efecto del medio, el BAP, el AIA, la interacción del medio con el BAP, del medio con AIA,

del BAP con el AIA, y la interacción de estos tres factores. El efecto que tuvo el tipo de medio sobre la oxidación se muestra en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Efecto de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) sobre la oxidación en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

	Medio A	Medio B	Medio C	P(F)
Oxidación 1 ¹	1.47 ^{3a}	1.29 ^b	1.03 ^c	0.0001
Oxidación 2 ²	1.86 ^a	1.67 ^b	1.12 ^c	0.0001

¹ Oxidación tomada a las 2 semanas de la siembra con CV%=33.85.

+Prueba DMS.

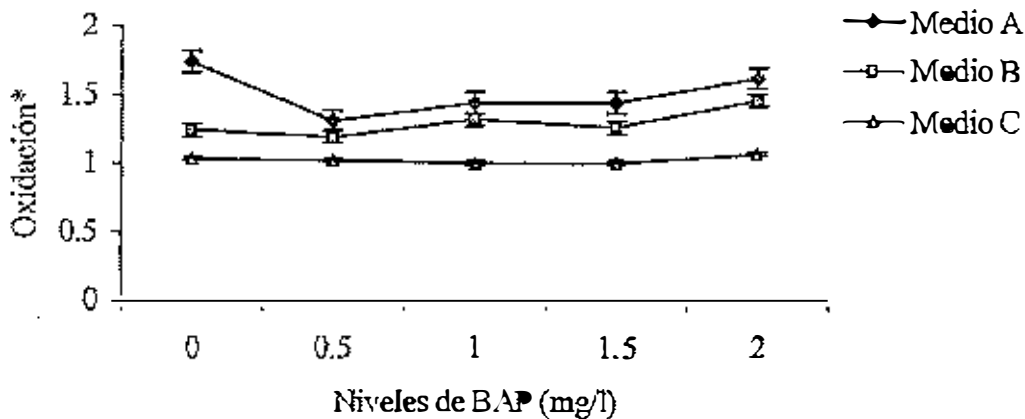
² Oxidación tomada a las 5 semanas de la siembra con CV%=39.58.

³ Medida en escala 1-3, siendo 1 ausencia de oxidación.

^{a, b} Medias con igual letra en la misma fila no difieren estadísticamente (P<0.1).

La mejor respuesta para reducir oxidación se obtuvo, en ambos casos, con medio que contiene carbón activado (medio C) para el control de oxidación, seguido por el medio que contiene ácido cítrico y ascórbico (medio B). Con el medio sin ningún tipo de control (medio A) para la oxidación se obtuvieron niveles más altos de oxidación, siendo las diferencias de respuesta presentadas todas significativamente diferentes. También se puede apreciar que la oxidación tiende a aumentar a las cinco semanas de la siembra.

La interacción de los tres tipos de medios utilizados y los cinco niveles de BAP, presentaron respuestas significantes en el grado de oxidación. El efecto de esta interacción se muestra en la Figura 2, Anexo II.

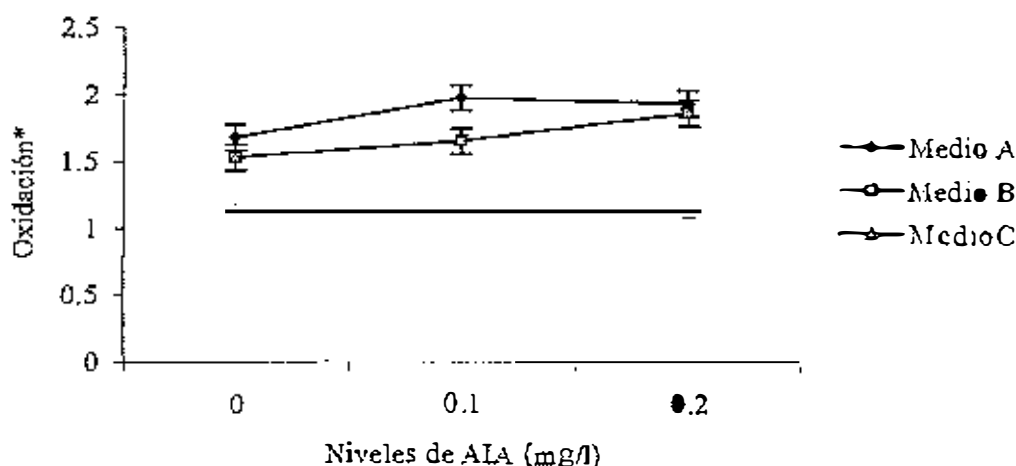


* Medida en escala 1-3, siendo 1 ausencia de oxidación.

Figura 2. Efecto de la interacción de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) con cinco niveles de BAP (mg/l) sobre la oxidación a las dos semanas de la siembra en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

La mejor respuesta se siguió dando con el medio que contenía carbón activado como control de oxidación, y con el medio sin ningún compuesto para controlar la oxidación se obtuvieron los peores índices de oxidación. Se observó en todos los medios de cultivo que un nivel de BAP de 0.5-1.5 mg/l, produce los mejores índices de respuesta de oxidación. Los extremos de las concentraciones usadas (0 y 2.0 mg/l) produjeron los índices más pobres de respuesta en presencia de los tres tipos de medio.

Los tres tipos de medio de cultivo utilizados en interacción con los tres niveles de AIA utilizados también produjeron diferencias significativas de respuesta de la oxidación (Figura 3, Anexo 12).



*Medida en escala 1-3, siendo 1 ausencia de oxidación.

Figura 3. Efecto de la interacción de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) con tres niveles de AIA (mg/l) sobre la oxidación a las cinco semanas de la siembra en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Invariablemente, el mejor control de la oxidación lo dio el medio que contenía carbón activado. Mientras que la concentración de auxinas tuvo un efecto variado, pero por lo general, a medida que aumenta la concentración de la misma, se aumenta la oxidación en los tres tipos de medio de cultivo.

La efectividad del carbón activado para el control de oxidación se debe a que es capaz de remover productos secundarios secretados por los tejidos cultivados (Dodds y Roberts, 1985). Según George (1996), puede absorber fenoles producidos comúnmente en tejidos heridos. La mezcla de ácido cítrico y ácido ascórbico es también efectiva, pero a menor grado. Esto se puede deber a la inestabilidad del ácido ascórbico en el medio por ser termolábil (George, 1996), pero sigue siendo lo suficientemente efectivo en comparación al medio que no contenía ningún tipo de compuesto antioxidante. El aumento de la

oxidación a medida que avanza el cultivo se debe a que la presencia de sustancias fenólicas muchas veces provoca que el explante continúe exudando, teniendo así un efecto catalítico.

La tasa natural de formación de algunos compuestos fenólicos depende de la tasa de crecimiento de los tejidos cultivados, y de los niveles de citoquininas y auxinas utilizados (George, 1996). Muchas veces las concentraciones altas de estos compuestos provocan un aumento en la oxidación de los tejidos cultivados. Las concentraciones altas de auxinas, en especial, se asocian con una mayor tasa de oxidación (George, 1996), lo cual se manifestó en el ensayo. Las citoquininas, hasta cierto punto, pueden inhibir la oxidación de algunos compuestos, incluyendo la oxidación del mismo AIA, reduciendo así la cantidad de fenóles producidos (George, 1993). Esto explica que las concentraciones medias de BAP hayan sido las más efectivas para el control de la oxidación.

4.1.2 Necrosis

La necrotización de tejidos se debió al tipo de medio utilizado y a los niveles de AIA. Los efectos de los medios sobre la necrosis se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Efecto de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) sobre la necrosis en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

	Medio A	Medio B	Medio C	P(F)
Necrosis 1 ¹	1.86 ^{3a}	1.78 ^b	1.23 ^c	0.0001
Necrosis 2 ²	2.14 ^a	1.98 ^b	1.44 ^c	0.0001

¹ Necrosis tomada a las 2 semanas de la siembra con CV%=31.57.

² Necrosis tomada a las 5 semanas de la siembra con CV%=28.13.

³ Medida en escala 1-3, siendo 1 ausencia de necrosis.

⁴ Medias con igual letra en la misma fila no difieren estadísticamente (P<0.1).

Al igual que la oxidación, la necrosis se vio mejor controlada por la presencia de carbón activado en el medio de crecimiento, seguido por el uso de ácido ascórbico y ácido cítrico. Las diferencias mostradas de respuesta al medio son significativamente diferentes. También se puede observar la tendencia de la necrosis a aumentar a medida que aumenta la edad del cultivo.

Independiente del efecto del medio de cultivo, el efecto que los tres niveles de AIA tuvieron sobre la necrosis se muestra en el Cuadro 6, mostrando respuestas similares a la oxidación.

Cuadro 6. Efecto de tres niveles de AIA (mg/l) sobre la necrosis a las dos semanas de la siembra en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

AIA (mg/l)	Necrosis ¹	P(F)
0	1.58 ^b	0.002
0.1	1.72 ^b	
0.2	1.56 ^a	

CV%=31.57

±Prueba DMS

^{a,b}Medias con igual letra no difieren estadísticamente ($P < 0.1$).

¹Medida en escala 1-3, siendo 1 ausencia de necrosis.

La mayor concentración de AIA en el medio de crecimiento produjo la menor presencia de necrotización de los tejidos. Los niveles más altos de necrosis se observaron con concentraciones bajas de AIA, siendo las diferencias entre 0 mg/l y 0.1 mg/l no significativas. Por lo que podemos asumir que estos niveles de AIA mostraron el mismo grado de necrosis.

El efecto de los medios de crecimiento y los reguladores de crecimiento sobre la necrosis aún no es muy claro. Las causas de la necrosis no han sido bien explicadas por ningún autor; inclusive en rosa miniatura no se considera como un problema. Esto se puede deber a que muchas veces su efecto sobre los tejidos es similar al de la oxidación. La necrosis provoca en rosa miniatura, puntas de los explantes quemadas o café, tal y como se describe la oxidación en muchos textos. La diferencia es que la necrosis no provoca exudación de compuestos al medio.

El efecto positivo del carbón activado puede deberse a que éste, además de absorber compuesto inhibitorios, provoca también el oscurecimiento del medio, simulando así las condiciones tradicionales de las plantas (Pierik, 1987). Como en el caso del ensayo, esto se pudo traducir a menos problemas relacionados con necrosis y oxidación.

El efecto de las auxinas es aún menos claro que el del carbón activado, ya que éstas más bien provocan la división celular y su elongación (CIAT, 1991). George (1993), apunta que el aumento de las concentraciones de AIA conlleva a una reducción progresiva del desarrollo de cloroplastos. Esto puede ser una explicación no tan acertada, ya que en el caso de este estudio, el menor grado de necrosis se dio con la mayor concentración de AIA, aunque el nivel intermedio provocó una mayor necrosis.

4.1.3 Peso promedio del brote por explante (PPB)

Muchas de las respuestas de las variables relacionadas con brotación no fueron lo suficientemente explicadas por el modelo. Sin embargo, el peso promedio del brote producido sí se puede explicar por el tipo de medio de cultivo utilizado, los niveles de BAP y AIA, y la interacción de los medios de cultivo con los niveles de BAP y AIA.

Los efectos en la respuesta del PPB al medio de cultivo utilizado se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Efecto de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) sobre el peso promedio (g) del brote por explante en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Medio	PPB ¹	P(F)
A	0.0996 ^b	0.0001
B	0.1312 ^a	
C	0.041 ^c	

CV%=94.81

+Prueba DMS

^{a,b}Medias con igual letra no difieren estadísticamente (P<0.1).

¹Peso promedio del brote (g) por explante.

La mejor respuesta de peso a los tres tipos de medio se dio con el medio que contenía ácido cítrico y ácido ascórbico. Los pesos más bajos se dieron en presencia de carbón activado, a pesar de que éste controla mejor la oxidación.

El BAP juega un papel importante en el desarrollo de brotes adventicios, su efecto sobre las yemas de rosa miniatura en el establecimiento se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Efecto de cinco niveles de BAP (mg/l) sobre el peso promedio (g) del brote por explante en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

BAP (mg/l)	PPB ¹	P(F)
0.0	0.0552 ^a	0.0001
0.5	0.0943 ^b	
1.0	0.1181 ^a	
1.5	0.1052 ^{ab}	
2.0	0.1186 ^a	

CV%=94.81

+Prueba DMS

^{a,b}Medias con igual letra no difieren estadísticamente (P<0.1).

¹Peso promedio del brote (g) por explante.

Independiente del medio de cultivo que se utilice, un nivel alto de BAP para el caso de rosa miniatura, de entre 1.0-2.0 mg/l produce las mejores respuestas de PPB. Los pesos más pobres se obtuvieron con la no inclusión de BAP al medio de cultivo, siendo esta diferencia significativa con el resto de las concentraciones probadas.

El AIA también juega un papel importante en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*. La respuesta del PPB a la presencia de este regulador de crecimiento se muestra en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Efecto de tres niveles de AIA (mg/l) sobre el peso promedio (g) del brote por explante en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

AIA (mg/l)	PPB ¹	P(F)
0.0	0.1192 ^a	0.0004
0.1	0.0949 ^b	
0.2	0.0808 ^b	

CV% = 4.81 +Prueba DMS

^{a,b} Medias con igual letra no difieren estadísticamente ($P < 0.1$).

¹ Peso promedio del brote (g) por explante.

El agregar AIA al medio de cultivo para rosa miniatura, provoca una disminución del PPB; contrario a todas las recomendaciones de agregar este regulador para mejorar la iniciación del cultivo *in vitro*. La interacción de los niveles de auxina con los tipos de medio sigue teniendo la misma respuesta, y su efecto es tan marcado que el medio tipo A es igual al medio B cuando no se usa este regulador de crecimiento, como lo muestra la Figura 4, Anexo 13.

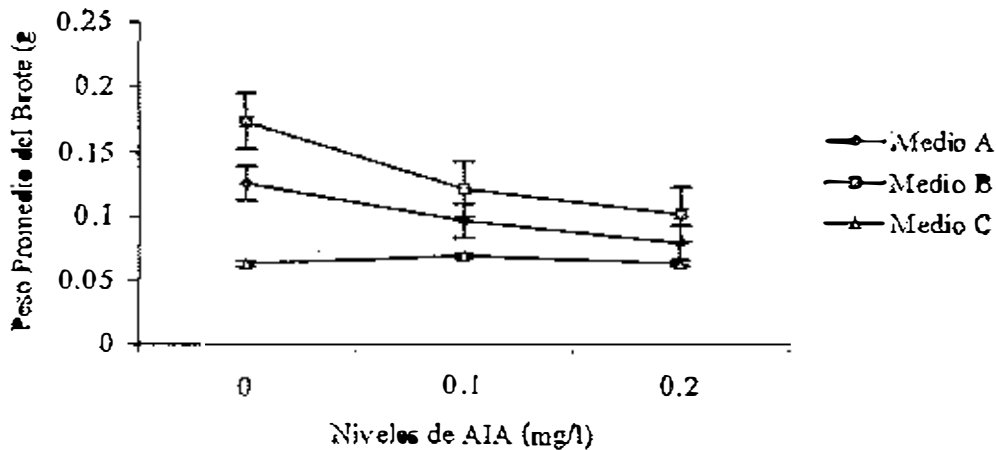


Figura 4. Efecto de la interacción de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) con tres niveles de AIA (mg/l) sobre el peso promedio (g) del brote por explante en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

La mejor combinación para obtener los mejores PPB es el uso del medio B con 0 mg/l de AIA, siendo estadísticamente diferentes a todos los otros niveles. Este peso es el mejor de los tratamientos y combinaciones probadas para esta variable. El medio C siguió demostrando su ineffectividad con los tres niveles de AIA.

La interacción de los tres tipos de medio de cultivo con los cinco niveles de BAP muestra una respuesta similar a la ya mostrada con los efectos simples de estas variables. Como muestra la Figura 5, Anexo 14, el medio B produce aún una mejora en el PPB al combinarlo con niveles altos de BAP. El no agregarle BAP a este medio provoca que su respuesta en el PPB se iguale a la combinación de medio y nivel de A1A que dieron las respuestas más bajas sobre el PPB. En general, se ve como la no-inclusión del BAP al medio de cultivo afecta reduciendo la respuesta del PPB en todos los medios de cultivo.

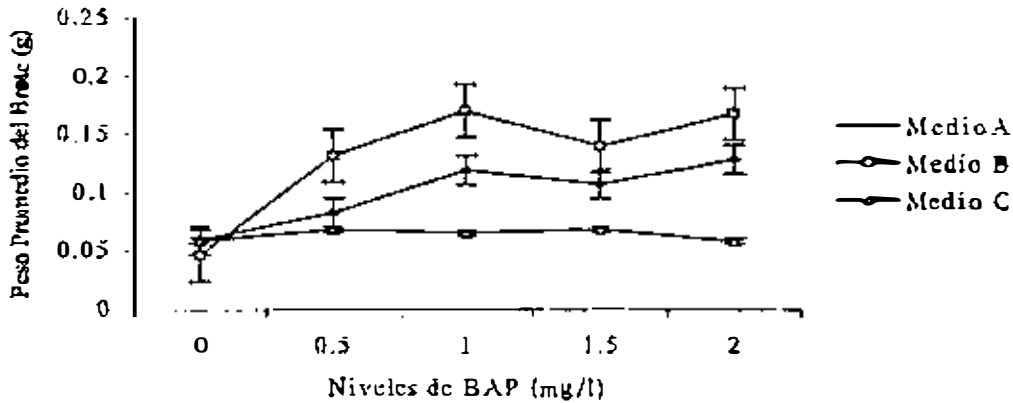


Figura 5. Efecto de la interacción de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) con cinco niveles de BAP (mg/l) sobre el peso promedio (g) del brote por explante en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Al provocar el medio C el menor grado de oxidación, se espera que su influencia positiva en éste aspecto se ven reflejado en los aspectos productivos del brote. En el caso particular de este ensayo, el medio C disminuyó más bien las respuestas de PPB. Según George (1993), los efectos benéficos del carbón activado dependen en su habilidad para absorber un amplio rango de compuesto. El problema es que no sólo absorbe sustancias inhibitorias de crecimiento, sino que además puede absorber algunos promotores de crecimiento e inclusive regular la cantidad disponible de ciertos reguladores de crecimiento (Dodds y Roberts, 1985). Según Kyte (1987), el carbón activado muy posiblemente absorba citoquininas haciéndolas no disponibles para el cultivo y provocando así resultado impredecibles, llegando hasta a inhibir el crecimiento y la morfogénesis.

El efecto del medio B sobre la mejora en respuesta del PPB se debe a su efecto antioxidante. Además, George (1996) indica que el ácido cítrico agregado al medio de cultivo puede actuar como buffer y como nutriente, lo que pudo haber ejercido un efecto positivo sobre la respuesta del PPB y resultando ser el mejor medio para obtener una respuesta favorable.

Las citoquininas juegan un papel importante en la brotación de yemas de rosa miniatura durante su establecimiento. El efecto de las citoquininas es más notable en el estímulo de la división celular y control de morfogénesis, por lo que son efectivas para promover la iniciación directa en los brotes (George, 1993). Esto se demostró claramente en este ensayo al tener el BAP un efecto positivo en los aumentos de pesos de los brotes producidos.

El BAP puede también tener un efecto positivo sobre la producción de brotes múltiples. Hasegawa (1980), demostró que el grado de formación de brotes múltiples de la rosa 'Improved Blazé' *in vitro* puede ser regulado principalmente con la adición de citoquinina, siendo la más efectiva el BAP. Según George (1993), el establecimiento y proliferación de brotes puede muchas veces ser satisfactoriamente promovido sólo por las citoquininas. Esto se demostró en el ensayo, ya que el uso de auxinas sin citoquininas al medio no se hizo necesario para obtener un brote de mayor peso.

Según Pierik (1987), esto se debe a que existen explantes que producen suficiente cantidad de auxinas, por lo que no necesitan una cantidad adicional para conseguir la extensión y/o división de tejidos. La rosa miniatura se comporta de esta forma. Además, George (1993) apunta que el AIA se desnaturaliza en el medio de cultivo y que el inicio de los brotes se da a medida que se reduce la concentración efectiva de este regulador.

Según Picrik (1987), las auxinas a altas concentraciones producen la inhibición de vástagos axilares y adventicios. Estímulan en su lugar la formación de callo que roba nutrimentos al brote para su mejor desarrollo.

Como se demostró en este ensayo, George (1993) demostró igualmente que la adición de auxinas, a medio de establecimiento con citoquininas, fue innecesaria en la iniciación de muchos cultivos. La rosa miniatura aparentemente no responde positivamente a la adición de AIA en la primera etapa. Se corroboró la idea de que una relación citoquinina-auxina alta es necesaria para la inducción directa de brotes en los explantes (Kyte, 1987). La comparación de las Figuras 4 y 5 demuestran que el efecto independiente del BAP sobre el PPB es más importante que el del AIA en rosa miniatura, ya que el medio B sin AIA resultó el mejor en su clase y el medio B sin BAP resultó con el PPB más bajo.

4.1.4 Callo

La presencia de callo se analizó en base a los factores más influyentes en el mismo que son: los niveles de AIA y la interacción de éstos niveles con los niveles de BAP, y el tipo de medio de cultivo utilizado. La influencia de los tres niveles de AIA sobre la formación o no de callo se muestran en el Cuadro 10. Estos resultados demuestran que el aumento de la concentración de auxinas, aumenta la presencia del callo en el desarrollo del explante. La mayor incidencia de callo se dio al nivel más alto de AIA, y el más bajo, cuando no se agregó AIA al medio de crecimiento.

Las auxinas se agregan a los medios en concentraciones altas para la formación de callo (Pierik, 198). Para este ensayo no se requería la formación de callo, ya que la brotación se espera que sea directamente de la yema para rosa miniatura. Esta formación de callo puede jugar un papel importante en la variable dependiente de peso, ya que la energía destinada a la formación del brote tiene que ser redireccionada a la formación de callo, resultando en un brote más pequeño y raquítico.

Cuadro 10. Efecto de tres niveles de AIA (mg/l) sobre la presencia de callo (%) en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

AIA (mg/l)	0	0.1	0.2	P
Presencia de callo	%			0.001
Sí	17.39 (32/184) ¹	41.71 (83/199)	47.03 (95/202)	
No	82.61 (152/184)	58.29 (116/199)	52.97 (107/202)	

¹() Frecuencia de incidencia de callo. +Prueba Chi-cuadrado

La forma en la que los niveles de AIA interactúan con los tres tipos de medio de cultivo se muestran en el Cuadro 11. Esta interacción es importante porque la diferencia de compuestos del medio puede afectar la respuesta del explante a la presencia de AIA.

Cuadro 11. Efecto de la interacción de tres niveles de AIA (mg/l) con tres tipos de medio de cultivo (A: ustigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) sobre la presencia de callo (%) en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Medio	AIA (mg/l)	Presencia de callo (%)		P
		Sí	No	
A	0.0	21.13 (15/71) ¹	78.87(56/71)	0.001
A	0.1	69.23 (45/65)	30.77 (20/65)	
A	0.2	71.43 (55/77)	28.57 (22/77)	
B	0.0	25.86 (15/58)	74.14 (43/58)	
B	0.1	53.13 (34/64)	46.88 (30/64)	
B	0.2	51.47 (35/68)	48.53 (33/68)	
C	0.0	3.64 (2/55)	96.36 (53/55)	
C	0.1	5.71 (4/70)	94.29 (66/70)	
C	0.2	8.77 (5/57)	91.23 (52/57)	

¹() Frecuencia de incidencia de callo. +Prueba Chi-cuadrado

El medio C en general, presentó los mejores controles para formación de callo, siendo el aumento de incidencia con relación al aumento de AIA no muy drástico como en el medio A y B; siendo el medio A con relación a los niveles de AIA, el más deficiente para controlar la formación de callo. Una concentración de 0.2 mg/l de AIA, ya resulta alta para el establecimiento de rosa miniatura, provocando la formación no requerida de callo.

El efecto del tipo de medio de cultivo en la mejora de la presencia de callo es notable. El uso de carbón activado reduce drásticamente la presencia de callo, por su habilidad de absorber compuestos del medio, como reguladores, regulando así la actividad del AIA en su formación de callo.

4.1.5 Vitrificación

La hiperhidratación de tejidos es un proceso difícil de controlar e impredecible. En este ensayo se presentó la vitrificación más relacionada a los aumentos de BAP, como se muestra en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Efecto de cinco niveles de BAP (mg/l) sobre la vitrificación (%) en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*. El Zamorano, Honduras, 2000.

BAP (mg/l)	Vitrificación (%)		P
	Sí	No	
0.0	2.56 (3/117) ¹	97.44 (114/117)	0.001
0.5	23.73 (28/118)	76.27 (90/118)	
1.0	24.75 (25/101)	75.25 (76/101)	
1.5	31.45 (39/124)	68.55 (85/124)	
2.0	30.23 (39/129)	69.77 (90/129)	

¹ () Frecuencia de incidencia de vitrificación.

+Prueba Chi-cuadrado

El aumento progresivo de los niveles de BAP, aumentan la presencia de vitrificación, pero esto se da hasta llegar a un nivel de 1.5 mg/l de BAP. Una concentración mayor muestra un descenso en la vitrificación. El medio que se combine puede afectar estas respuestas, como se muestra en el Cuadro 13. El uso de carbón activado reduce el efecto del BAP en provocar la hiperhidratación de tejidos.

La única presencia de vitrificación en el medio C se dio con niveles de 0.5 y 2.0 mg/l de BAP. Además, en presencia de carbón activado en el medio de cultivo, la disminución de vitrificación se dio a medida que disminuyen los niveles de BAP, y no a medida que aumentan los niveles, como se observó con el efecto simple del BAP independiente del medio que se utilizó. A excepción del medio C, todos los medios que se estudiaron aumentan la respuesta de vitrificación a medida que aumentan los niveles de BAP.

Cuadro 13. Efecto de la interacción de cinco niveles de BAP (mg/l) con tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) sobre la vitrificación (%) en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Medio	BAP (mg/l)	Vitrificación (%)		P
		Si	No	
A	0.0	4.44 (2/45) ¹	95.56 (43/45)	0.001
A	0.5	35.71 (15/42)	64.29 (27/42)	
A	1.0	24.39 (10/41)	75.61 (31/41)	
A	1.5	51.11 (23/45)	48.89 (22/45)	
A	2.0	39.53 (17/43)	60.47 (26/43)	
B	0.0	2.50 (1/40)	97.50 (39/40)	
B	0.5	34.29 (12/35)	65.71 (23/35)	
B	1.0	50.00 (15/30)	50.00 (15/30)	
B	1.5	41.03 (16/39)	58.97 (23/39)	
B	2.0	44.58 (21/47)	55.32 (26/47)	
C	0.0	0.00 (0/32)	100 (32/32)	
C	0.5	2.44 (1/41)	97.56 (40/41)	
C	1.0	0.00 (0/30)	100 (30/30)	
C	1.5	0.00 (0/40)	100 (40/40)	
C	2.0	2.56 (1/39)	97.44 (38/39)	

¹ () Frecuencia de incidencia de vitrificación.

+Prueba Chi-cuadrado

La vitrificación es bajo la influencia de altas tasas de citoquininas (George, 1993). A estas altas tasas de citoquininas, los brotes muestran una mayor susceptibilidad a la vitrificación. Para el establecimiento de rosa miniatura, esa susceptibilidad se observó en mayor proporción a niveles de 1.0-1.5mg/l de BAP.

La vitrificación también está determinada por la cantidad de solutos en el medio (Pierik, 1987). A mayor cantidad de solutos, menor vitrificación por el potencial osmótico del mismo. El carbón activado aumenta la cantidad de solutos, reduciendo así la vitrificación. Además, como ya se había mencionado, tiene la capacidad de reducir la cantidad disponible de reguladores de crecimiento en el medio (Kyte, 1987) lo que reduce el efecto que éstos puedan presentar sobre el porcentaje de vitrificación.

Si consideramos sólo la vitrificación, se podría inferir que para el establecimiento de rosa miniatura se hace favorable el uso de carbón activado. Pero tomando en cuenta el factor productivo de peso, este compuesto no compensa su efecto positivo por la disminución que provoca en el efecto que tiene de absorber nutrientes del medio, incluyendo los reguladores de crecimiento.

4.2 ANALISIS ECONOMICO

4.2.1 Determinación de costos.

La determinación de costos se hizo para cada 200 ml de medio que se usó por tratamiento. Los costos comunes se calcularon en base a la cantidad de solución madre utilizada. El tipo de agente para controlar la oxidación y las concentraciones de BAP y AIA utilizadas, representan los costos diferenciales. Los costos totales por tratamiento se muestran en el Anexo 15.

Los costos por unidad de producto se calcularon en base a la cantidad de brotes estándares producidos en cada tratamiento en relación a los costos de cada tratamiento. Los costos por tratamiento y por unidad de producto se muestran en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Costo por medio de cultivo y por brote estándar producido en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Medio	BAP (mg/l)	AIA (mg/l)	Costo por Medio (US\$)	No. Brote Estándares	Costo por Brote Estándar (US\$)
A	0	0	0.3507	6.1	0.06
A	0	0.1	0.3509	4.0	0.09
A	0	0.2	0.3512	6.8	0.05
A	0.5	0	0.3518	6.8	0.05
A	0.5	0.1	0.3551	12.0	0.03
A	0.5	0.2	0.3553	5.3	0.07
A	1.0	0	0.3590	10.0	0.04
A	1.0	0.1	0.3592	7.8	0.05
A	1.0	0.2	0.3595	10.1	0.04
A	1.5	0.0	0.3631	14.5	0.03
A	1.5	0.1	0.3634	4.6	0.08
A	1.5	0.2	0.3636	4.6	0.08
A	2.0	0.0	0.3673	13.1	0.03
A	2.0	0.1	0.3675	14.7	0.03
A	2.0	0.2	0.3678	8.4	0.04
B	0	0.0	0.3816	2.6	0.15
B	0	0.1	0.3818	5.3	0.07
B	0	0.2	0.3821	5.3	0.07
B	0.5	0.0	0.3857	12.6	0.03
B	0.5	0.1	0.3860	16.8	0.02
B	0.5	0.2	0.3862	6.8	0.06
B	1.0	0.0	0.3899	10.6	0.04
B	1.0	0.1	0.3901	9.8	0.04
B	1.0	0.2	0.3904	9.6	0.04
B	1.5	0.0	0.3940	15.3	0.03
B	1.5	0.1	0.3943	9.4	0.04
B	1.5	0.2	0.3945	6.1	0.06

...Cuadro 14 continuado.

Medio	BAP (mg/l)	ALA (mg/l)	Costo por Medio (US\$)	No. Brotes Estándares	Costo por Brote Estándar (US\$)
B	2.0	0.0	0.3982	17.0	0.02
B	2.0	0.1	0.3984	20.3	0.02
B	2.0	0.2	0.3987	17.5	0.02
C	0	0.0	0.7354	2.7	0.27
C	0	0.1	0.7357	7.5	0.10
C	0	0.2	0.7359	2.4	0.31
C	0.5	0.0	0.7396	8.3	0.09
C	0.5	0.1	0.7398	3.9	0.19
C	0.5	0.2	0.7401	5.8	0.13
C	1.0	0.0	0.7437	0.9	0.83
C	1.0	0.1	0.7440	4.4	0.17
C	1.0	0.2	0.7442	2.8	0.27
C	1.5	0.0	0.7479	5.1	0.15
C	1.5	0.1	0.7481	7.8	0.10
C	1.5	0.2	0.7484	4.5	0.17
C	2.0	0.0	0.7520	3.3	0.23
C	2.0	0.1	0.7523	5.3	0.14
C	2.0	0.2	0.7525	4.6	0.16

Los costos más altos por tratamiento fueron lo que llevaban carbón activado (medio C), y los de menores costos fueron aquellos que no llevaban ningún compuesto para controlar oxidación (medio A). A medida que se aumentan las concentraciones de reguladores, se aumentan los costos de los medio de cultivo.

Los costos más bajos por brote estándar producido fueron los del medio conteniendo ácido cítrico y ácido ascórbico como antioxidantes, y con 2.0mg/l de BAP, en los tres niveles de ALA utilizados. Aunque el costo de este medio incrementa con el incremento de ALA, aumenta también el número de brotes estándares producidos, reduciendo así el costo para producir cada uno de éstos. Este medio, o permitió una mayor producción de brotes adventicios por la alta tasa de citoquinina utilizada, o mejoró la calidad de los brotes producidos en comparación a los otros tratamientos.

4.2.2 Evaluación estadística de costos.

La evaluación estadística de costos se realizó sobre los costos promedios de cada tratamiento. Este valor difiere del costo por brote porque en el costo promedio por tratamiento sólo los explantes que produjeron brotes de calidad se consideraron. Todos los explantes que no produjeron un brote, o produjeron un brote de calidad 0 no fueron considerados, elevando así el costo promedio. Los costos fueron absorbidos por los brotes de calidad 1-3.

El resultado del análisis estadístico se muestra en el Anexo 16. Los mayores costos promedios están asociados con el uso de carbón activado, ya que la adición de éste al medio aumenta los costos que no se ve traducido en una mayor producción de brotes estándares. Aunque no todos los costos promedios del medio C son los estadísticamente inferiores, todos estos se agrupan entre los costos más elevados de medio de cultivo.

Los medios que presentaron menores costos, aunque sin diferencias significativas, se asocian con los medios A y B, más que todo con el B y con el nivel de 0 mg/l de AIA. El nivel de citoquinina no tuvo un efecto tan marcado sobre los costos promedios.

En general, se puede establecer que para el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, el medio B con 0 mg/l de AIA genera los mejores resultados económicos, en cuanto a costo promedio se refiere.

4.2.3 Evaluación Económica: productividad máxima y costo mínimo

La evaluación económica se realizó contrastando el promedio de brotes estándares producidos por tratamiento contra el costo promedio por brote estándar. Los costos marginales permiten evaluar los aumentos de los costos al aumentar producción, esperándose un aumento de costo por aumento de producción. Para este análisis se eliminaron todos aquellos tratamientos cuyo costo fue superior al costo mínimo para producir la misma o mayor cantidad de brotes, a los que se les llama dominados. Quedando sólo los dominantes para el análisis de costos marginales. En el Anexo 17 se muestran los costos dominados y los dominantes.

Los costos dominantes del análisis de costos mínimos nos generan sólo dos costos dominantes. La diferencia en producción de estos costos es de 90%, con una diferencia en costos de tan sólo 16%. En este aumento de costo se ve más que todo involucrado un aumento de uso de reguladores de crecimiento, pero su uso se ve traducido muy favorablemente en la producción. Un aumento relativamente bajo de costos, nos da aumentos bastante altos de producción. La diferencia entre estos dos tratamientos no es significativa, por lo que un análisis marginal no es válido.

5. CONCLUSIONES

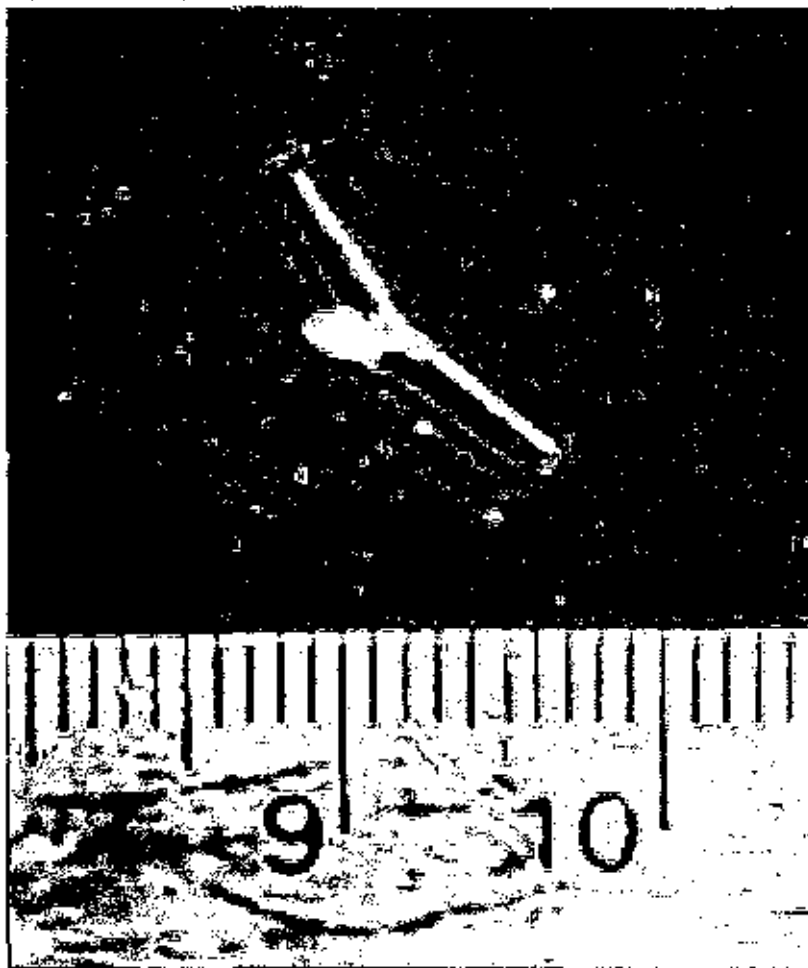
- El carbón activado en el establecimiento de rosa *miniatura* controla bien la oxidación y la necrosis, pero reduce los pesos de los brotes producidos.
- El uso de ácido cítrico y ácido ascórbico es efectivo en el control de oxidación en el establecimiento de rosa *miniatura*, y además favorable, por el aumento de peso observados en los brotes.
- La adición absoluta de ácido indoleacético (AIA) sin una citoquinina presente, para el establecimiento de rosa *miniatura* no es necesario porque no produce una brotación favorable de las yemas y en una dosis alta de 0.2 mg/l produce callo, que es indeseable en este método de micropropagación.
- La benzilaminopurina (BAP) debe utilizarse en una dosis de 1-2 mg/l en el medio de establecimiento de rosa *miniatura*, ya que a estas dosis da un buen peso del brote producido y la oxidación a estos niveles es aceptable.
- Agroeconómicamente, para el establecimiento de rosa *miniatura*, un medio que incluya ácido cítrico y ascórbico, un nivel de BAP de 2.0 mg/l y 0 mg/l de AIA da resultados favorables: Este medio da buenas respuestas de los brotes a costos bastante bajos, en especial en términos de brotes producidos.
- Para el establecimiento de rosa *miniatura in vitro* se hace necesario controlar factores como la procedencia del material vegetal y el genotipo utilizado.
- Trabajar con material traído directamente del campo es un proceso delicado que consume mucho tiempo y mano de obra, ya que este material viene con niveles de contaminación demasiado elevados, lo que dificulta el establecimiento del cultivo *in vitro*. De preferencia, el material deberá proceder de un invernadero, en el cual tanto el ambiente como la sanidad de la planta estén bien controlados. Si se tiene que trabajar con material traído del campo, éste debe sujetarse a un manejo riguroso de sanidad.

6. RECOMENDACIONES

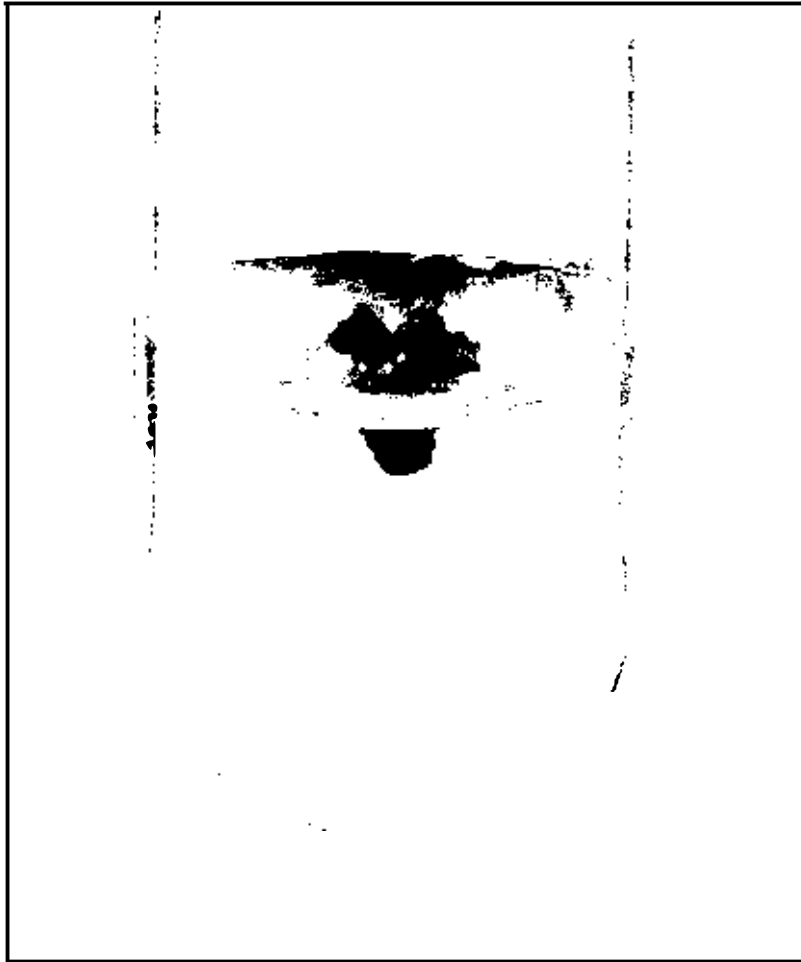
- Utilizar material vegetal de una misma procedencia para futuros ensayos de rosa miniatura.
- Aumentar la cantidad de material vegetal disponible como plantación madre en el invernadero de rosa miniatura.
- Probar las dosis recomendadas de los diferentes compuestos para determinar si éstos no tienen un efecto detrimental en las etapas siguientes del cultivo.
- Utilizar diferentes tipos de auxinas para determinar si alguna otra es efectiva en el establecimiento de rosa miniatura, ya que el AIA se considera la auxina más débil e inestable.
- Al preparar el medio de cultivo, asegurar una buena distribución de partículas, en especial de carbón activado que tiende a asentarse en el fondo del tubo.
- La etapa de establecimiento debería llevarse a cabo por cuatro semanas, en lugar de cinco. A las cinco semanas comienzan a mostrarse deficiencias que indican la necesidad de pasar el material a un medio fresco.

8. ANEXOS

Anexo 1. Segmento nodal para el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.



Anexo 2. Yema brotada en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

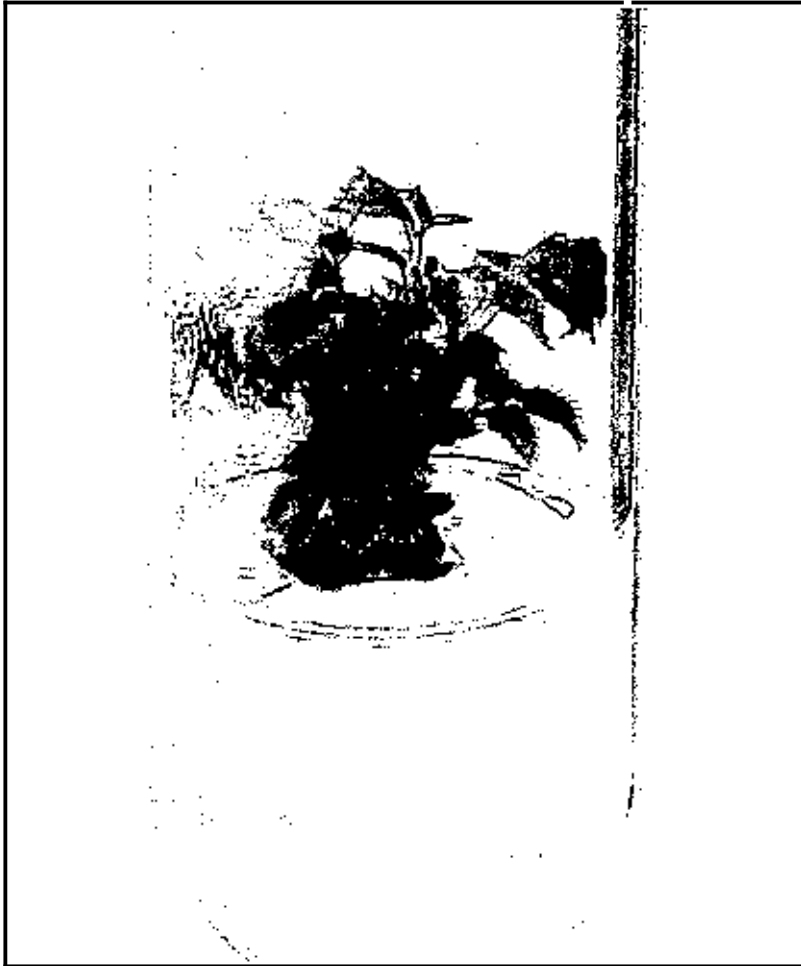


7. BIBLIOGRAFÍA

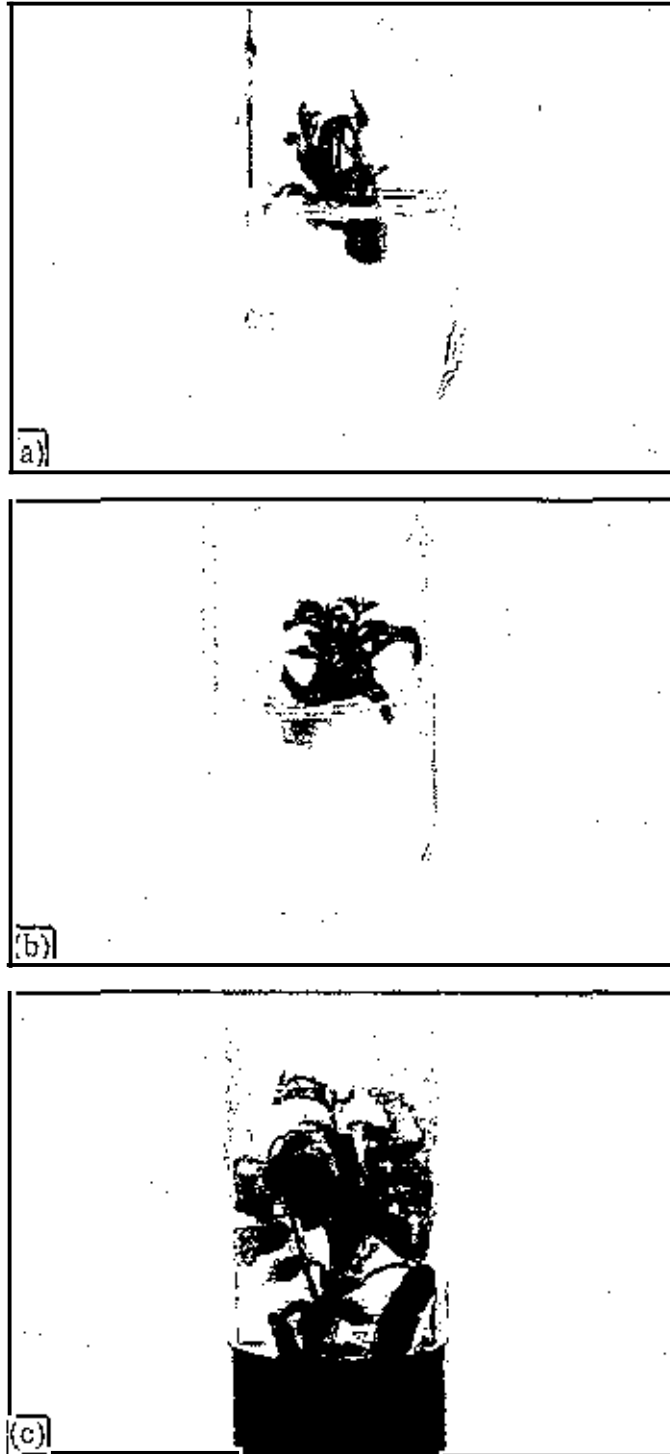
- BRESSAN, P.H.; KIM, Y.J.; HYDMAN, S.E.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. 1982. Factors affecting *in vitro* propagation of rose. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 107(6):979-990.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. *Cultivo de tejidos en la agricultura; Fundamentos y aplicaciones*. Ed Roca, W.N.; Mroginski, L.A., Cali, Colombia. 379 p.
- DODDS, J.H.; ROBERTS, L.W. 1985. *Experiments in plant tissue culture*. 2nd ed. Cambridge University Press. NY, USA. 232 p.
- GEORGE, E.F. 1993. *Plant propagation by tissue culture, Part 1, The Tecnology*. 2nd Ed. Exegetics Ltd. Edington, England. 555 p.
- _____. 1996. *Plant propagation by tissue culture, Part 2, InPractice*. 2nd Ed. Exegetics Ltd. Edington, England. 632 p.
- HASEGAWA, P.M. 1979. *In vitro* propagation of rose. *HortScience* 14(5):610-612.
- _____. 1980. Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 105(2):216-220.
- KANE, M. 1988. *Micropropagation of miniature rose*. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida.
- KYTE, L. 1987. *Plants from test tube—an introduction to micropropagation*. Timber Press, Inc. Portland, Oregon. 160 p.
- KHOSH-KHUI, M.; SIN, K.C. 1982. Micropropagation of new and old world rose species. *Journal of Horticultural Science* 57(3):315-319.
- MARCELIS-VAN ACKER, C.A.M.; SHOLTEN, H.J. 1995. Development of axillary buds of rose *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 63:47-55.
- MENSUALI-SODI, A.; PANIZZA, M.; SERA, G.; TOGNONI, F. 1993. Involvement of activated charcoal in the modulation of abiotic and biotic ethylene levels in tissue cultures. *Scientia Horticulturae* 54:49-57

- PIERIK, R.L.M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 343 p.
- PODWYSZYNSKA, M.; OLSZEWSKI, T. 1995. Influence of gelling agents on shoot multiplication and the uptake of macroelements by *in vitro* culture of rose, cordyline and homalomena. *Scientia Horticulturae* 64:77-84.
- THORPE, T. 1981. *Plant tissue culture: methods and applications in agriculture*. Academic Press. NY, USA. 379 p.
- ZAR, J.H. 1984. *Biostatistical Analysis*. 2nd ed. Prentice hall, Englewood Cliffs. N.J. 718 p.

Anexo 3. Lamina foliar abierta en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

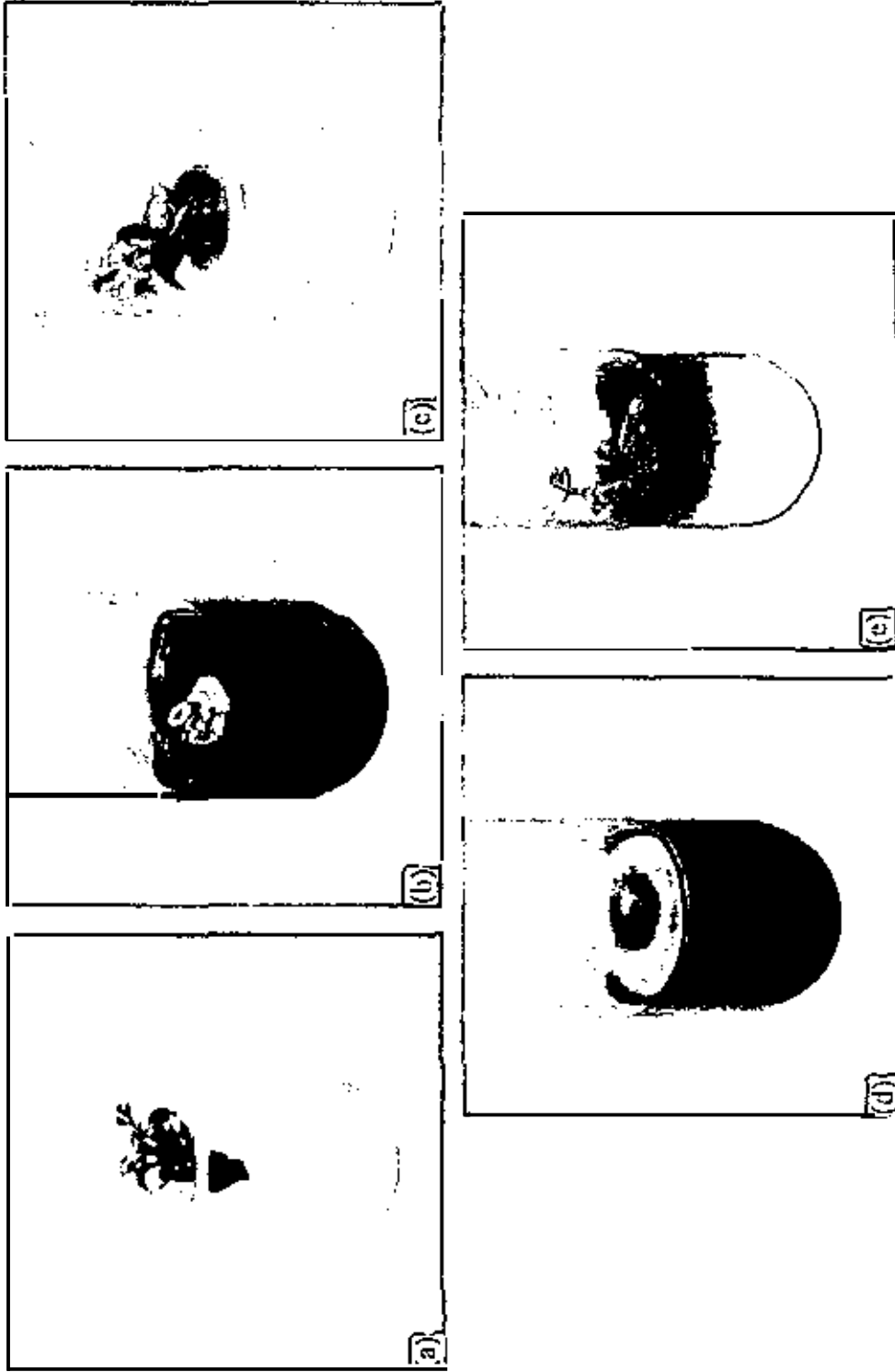


Anexo 4. Categorías de vigor en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.



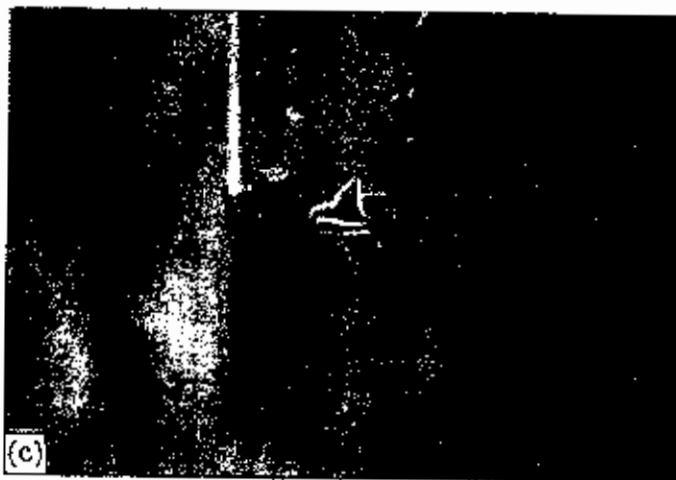
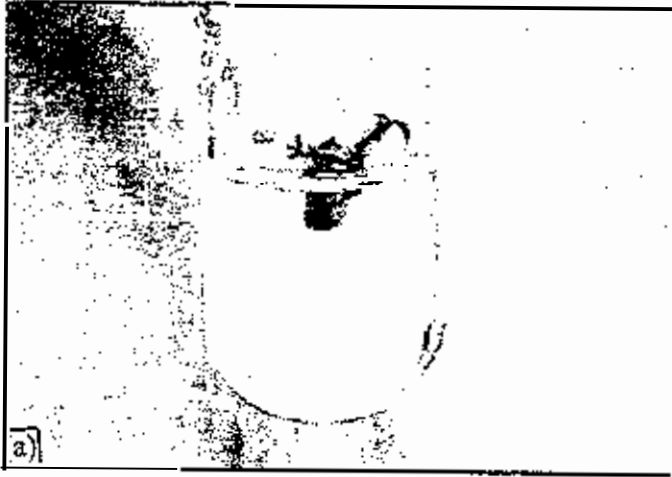
Categorías de vigor: (a) vigor 1; (b) vigor 2; (c) vigor 3.

Anexo 5. Categorías de contaminación en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.



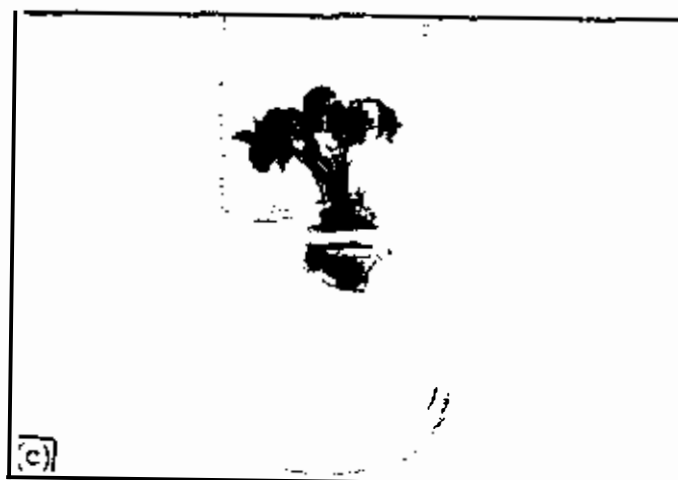
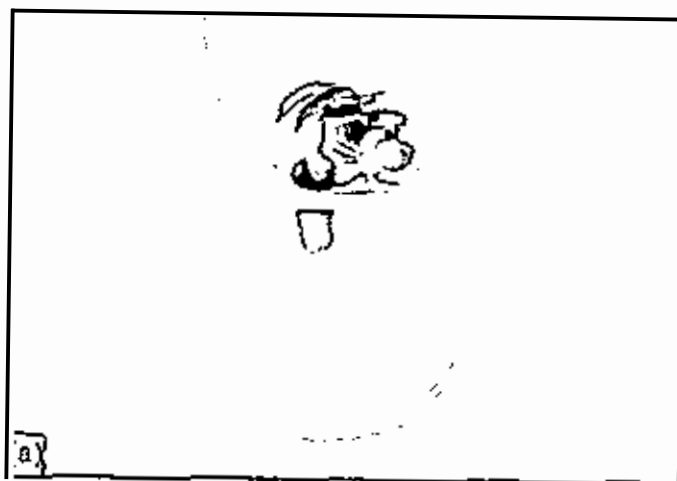
Categorías de contaminación: (a) contaminación 1; (b) contaminación 2; (c) contaminación 3; (d) contaminación 4; (e) contaminación 5.

Anexo 6. Categorías de oxidación en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.



Categorías de oxidación: (a) oxidación 1; (b) oxidación 2; (c) oxidación 3.

Anexo 7. Categorías de necrosis en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

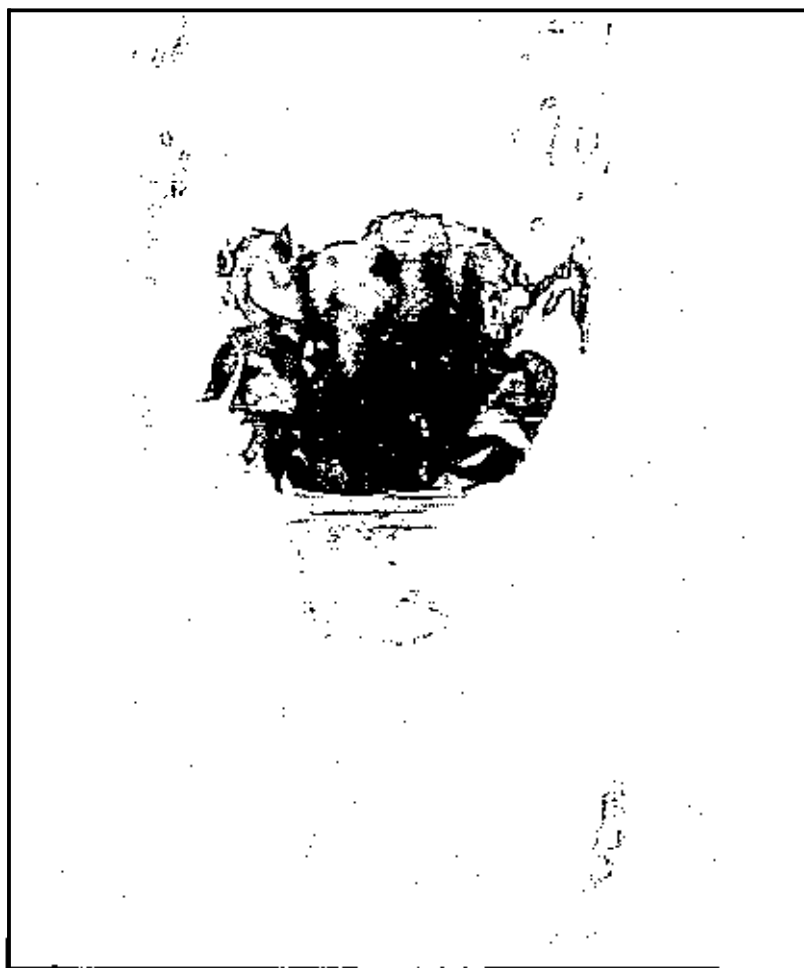


Categorías de necrosis: (a) necrosis 1; (b) necrosis 2; (c) necrosis 3.

Anexo 3. Presencia de callo en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.



Anexo 9. Presencia de vitrificación en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.



Anexo 10. Análisis de Varianzas de las variables estudiadas en el establecimiento de rosa miniatura *In vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Fuente de variación	Días a brotación (DB)			Apertura lamina foliar (ALF)			Diferencia (ALF-DB)		
	GL ^a	CM ^b	P(F)	GL	CM	P(F)	GL	CM	P(F)
Medio	2	127.52	0.1088	2	1221.09	0.0009	2	950.87	0.0002
BAP	4	99.30	0.1408	4	636.50	0.0057	4	516.90	0.0010
AIA	2	60.49	0.3484	2	67.78	0.6761	2	36.95	0.7156
Medio*BAP	8	54.24	0.4768	8	303.10	0.0841	8	248.38	0.0227
Medio*AIA	4	9.46	0.9560	4	229.96	0.2579	4	158.08	0.2218
BAP*AIA	8	49.71	0.5433	8	215.51	0.2701	8	130.57	0.3069
Medio*BAP*AIA	16	49.65	0.6082	16	122.37	0.7879	16	77.68	0.7913
Modelo									
P(F)		0.6019			0.0058			0.0004	
CME ^c		57.28			173.04			110.35	
R ²		0.0608			0.1168			0.1336	
CV%		76.6663			116.24			127.13	

^aGrados de libertad

^bCuadrado medio

^cCuadrado medio del error.

..Anexo 10 continuado.

Fuente de variación	No. de hojas			Vigor 1			Vigor 2			Contaminación		
	GL	CM	P(F)	GL	CM	P(F)	GL	CM	P(F)	GL	CM	P(F)
Medio	2	5.91	0.1824	2	0.12	0.7085	2	4.10	0.0063	2	2.39	0.1991
BAP	4	12.29	0.0075	4	0.56	0.1678	4	1.20	0.2008	4	3.93	0.0316
AIA	2	15.48	0.0122	2	1.19	0.0329	2	2.51	0.0443	2	1.58	0.3434
Medio*BAP	8	5.66	0.1149	8	0.73	0.0328	8	1.59	0.0463	8	1.41	0.4695
Medio*AIA	4	5.99	0.1442	4	0.21	0.6561	4	0.46	0.6841	4	2.01	0.2460
BAP*AIA	8	1.97	0.8055	8	0.50	0.1771	8	0.79	0.4488	8	1.29	0.5367
Medio*BAP*AIA	16	5.46	0.0731	16	0.59	0.0388	16	1.10	0.1457	16	1.62	0.3528
Modelo												
P(F)	0.0018			0.0104			0.0077			0.1625		
CME	3.49			0.34			0.80			1.48		
R ²	0.1246			0.1085			0.1165			0.0596		
CV%	144.01			40.737			48.620			65.846		

Fuente de variación	Oxidación 1			Oxidación 2			Necrosis 1			Necrosis 2		
	GL	CM	P(F)	GL	CM	P(F)	GL	CM	P(F)	GL	CM	P(F)
Medio	2	11.20	0.0001	2	26.91	0.0001	2	4.10	0.0001	2	2.39	0.0001
BAP	4	0.60	0.0162	4	0.35	0.5581	4	1.20	0.5587	4	3.93	0.8186
AIA	2	0.00	0.9864	2	1.93	0.0047	2	2.51	0.0024	2	1.58	0.1922
Medio*BAP	8	0.48	0.0136	8	0.48	0.2983	8	1.59	0.7831	8	1.41	0.9792
Medio*AIA	4	0.05	0.9031	4	0.77	0.0846	4	0.46	0.1724	4	2.01	0.2286
BAP*AIA	8	0.13	0.7058	8	0.71	0.0846	8	0.79	0.7933	8	1.29	0.7401
Medio*BAP*AIA	16	0.28	0.1153	16	0.60	0.0895	16	1.10	0.7902	16	1.62	0.8060
Modelo												
P(F)	0.0001			0.0001			0.0001			0.0001		
CME	0.19			0.39			0.27			0.28		
R ²	0.2222			0.3316			0.2658			0.2959		
CV%	33.853			39.576			31.566			28.133		

...Anexo 10 continuado.

Fuente de variación	No. de brotes			Largo del brote por explante			Peso del brote por explante			Calidad		
	GL	CM	P(F)	GL	CM	P(F)	GL	CM	P(F)	GL	CM	P(F)
Medio	2	24.46	0.0001	2	42.82	0.4679	2	0.20	0.0001	2	2.55	0.1868
BAP	4	8.98	0.0001	4	63.51	0.3423	4	0.08	0.0001	4	0.95	0.6434
AIA	2	3.79	0.0140	2	170.69	0.0491	2	0.07	0.0004	2	3.11	0.1297
Medio*BAP	8	2.58	0.0104	8	49.84	0.5286	8	0.02	0.0062	8	1.85	0.2851
Medio*AIA	4	1.15	0.4082	4	23.30	0.7988	4	0.02	0.0506	4	0.77	0.7306
BAP*AIA	8	0.56	0.4467	8	54.52	0.4598	8	0.01	0.2990	8	0.87	0.7988
Medio*BAP*AIA	16	0.64	0.4930	16	58.07	0.4210	16	0.01	0.3513	16	2.31	0.0860
Modelo												
P(F)	0.0001			0.4823			0.0001			0.2881		
CMB	0.49			56.30			0.008			1.52		
R ²	0.1903			0.0750			0.2228			0.0835		
CV%	49.100			65.213			94.814			101.369		

Anexo 11. Efecto de la interacción de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) con cinco niveles de BAP (mg/l) sobre la oxidación a las dos semanas de la siembra en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Medio	BAP (mg/l)	Oxidación ¹	P(F)
A	0.0	1.74 ^t	0.013
A	0.5	1.31 ^{cd}	
A	1.0	1.44 ^{de}	
A	1.5	1.44 ^{de}	
A	2.0	1.62 ^e	
B	0.0	1.24 ^c	
B	0.5	1.19 ^{bc}	
B	1.0	1.32 ^{cd}	
B	1.5	1.26 ^c	
B	2.0	1.46 ^{de}	
C	0.0	1.03 ^a	
C	0.5	1.02 ^a	
C	1.0	1.00 ^a	
C	1.5	1.00 ^a	
C	2.0	1.07 ^{ab}	

CV%=33.85

+Prueba DMS

^{a,b} Medias con igual letra no difieren estadísticamente (P<0.1).

¹ Medida en escala 1-3, siendo 1 ausencia de oxidación.

Anexo 12. Efecto de la interacción de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) con tres niveles de ALA (mg/l) sobre la oxidación a las cinco semanas de la siembra en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Medio	ALA (mg/l)	Oxidación ¹	P(F)
A	0.0	1.67 ^{bc}	0.084
A	0.2	1.93 ^{cd}	
B	0.0	1.52 ^b	
B	0.1	1.65 ^{bc}	
B	0.2	1.86 ^{cd}	
C	0.0	1.12 ^a	
C	0.1	1.13 ^a	
C	0.2	1.12 ^a	

CV%=39.58

+Prueba DMS

^{a,b} Medias con igual letra no difieren estadísticamente (P<0.1).

¹ Medida en escala 1-3, siendo 1 ausencia de oxidación.

Anexo 13. Efecto de la interacción de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) con tres niveles de AIA (mg/l) sobre el peso (g) del brote producido en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Medio	AIA (mg/l)	PPB ¹	P(F)
A	0.0	0.1242 ^b	0.0506
A	0.1	0.0958 ^{cd}	
A	0.2	0.0787 ^{de}	
B	0.0	0.1720 ^a	
B	0.1	0.1206 ^{bc}	
B	0.2	0.1009 ^{bcd}	
C	0.0	0.0614 ^e	
C	0.1	0.0682 ^e	
C	0.2	0.0628 ^e	

CV%=94.81

+Prueba DMS

^{a,b} Medias con igual letra no difieren estadísticamente (P<0.1)

¹ Peso promedio del brote (g)

Anexo 14. Efecto de la interacción de tres tipos de medio de cultivo (A: testigo; B: con ácido cítrico y ácido ascórbico; C: con carbón activado) con cinco niveles de BAP (mg/l) sobre el peso (g) del brote producido en el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Medio	BAP (mg/l)	PPB ¹	P(F)
A	0.0	0.0599 ^{dc}	0.0062
A	0.5	0.0828 ^{cd}	
A	1.0	0.1194 ^b	
A	1.5	0.1073 ^{bc}	
A	2.0	0.1286 ^b	
B	0.0	0.0465 ^d	
B	0.5	0.1316 ^b	
B	1.0	0.1705 ^a	
B	1.5	0.1397 ^{ab}	
B	2.0	0.1675 ^a	
C	0.0	0.0593 ^{dc}	
C	0.5	0.0684 ^{de}	
C	1.0	0.0658 ^{de}	
C	1.5	0.0638 ^{de}	
C	2.0	0.0583 ^{de}	

CV%=94.81

+Prueba DMS

^{a,b} Medias con igual letra no difieren estadísticamente (P<0.1)

¹ Peso promedio del brote (g)

Anexo 15. Costo totales (US\$) por tratamiento para el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Medio	Medio base	RAP	AIA	Acido cítrico	Acido ascórbico	Carbón activado	TOTAL
1	0.350695	0	0	0	0.00	0	0.3507
2	0.350695	0	0.00024	0	0.00	0	0.3509
3	0.350695	0	0.00048	0	0.00	0	0.3512
4	0.350695	0.00415	0	0	0.00	0	0.3548
5	0.350695	0.00415	0.00024	0	0.00	0	0.3551
6	0.350695	0.00415	0.00048	0	0.00	0	0.3553
7	0.350695	0.0083	0	0	0.00	0	0.3590
8	0.350695	0.0083	0.00024	0	0.00	0	0.3592
9	0.350695	0.0083	0.00048	0	0.00	0	0.3595
10	0.350695	0.01245	0	0	0.00	0	0.3631
11	0.350695	0.01245	0.00024	0	0.00	0	0.3634
12	0.350695	0.01245	0.00048	0	0.00	0	0.3636
13	0.350695	0.0166	0	0	0.00	0	0.3673
14	0.350695	0.0166	0.00024	0	0.00	0	0.3675
15	0.350695	0.0166	0.00048	0	0.00	0	0.3678
16	0.350695	0	0	0.0018	0.03	0	0.3816
17	0.350695	0	0.00024	0.0018	0.03	0	0.3818
18	0.350695	0	0.00048	0.0018	0.03	0	0.3821
19	0.350695	0.00415	0	0.0018	0.03	0	0.3857
20	0.350695	0.00415	0.00024	0.0018	0.03	0	0.3860
21	0.350695	0.00415	0.00048	0.0018	0.03	0	0.3862
22	0.350695	0.0083	0	0.0018	0.03	0	0.3899
23	0.350695	0.0083	0.00024	0.0018	0.03	0	0.3901
24	0.350695	0.0083	0.00048	0.0018	0.03	0	0.3904
25	0.350695	0.01245	0	0.0018	0.03	0	0.3940
26	0.350695	0.01245	0.00024	0.0018	0.03	0	0.3943
27	0.350695	0.01245	0.00048	0.0018	0.03	0	0.3945

... Anexo 15 continuado.

Medio	Medio base	BAP	AIA	Acido cítrico	Acido ascórbico	Carbón activado	TOTAL
28	0.350695	0.0166	0	0.0018	0.03	0	0.3982
29	0.350695	0.0166	0.00024	0.0018	0.03	0	0.3984
30	0.350695	0.0166	0.00048	0.0018	0.03	0	0.3987
31	0.350695	0	0	0	0.00	0.38	0.7354
32	0.350695	0	0.00024	0	0.00	0.38	0.7357
33	0.350695	0	0.00048	0	0.00	0.38	0.7359
34	0.350695	0.00415	0	0	0.00	0.38	0.7396
35	0.350695	0.00415	0.00024	0	0.00	0.38	0.7398
36	0.350695	0.00415	0.00048	0	0.00	0.38	0.7401
37	0.350695	0.0083	0	0	0.00	0.38	0.7437
38	0.350695	0.0083	0.00024	0	0.00	0.38	0.7440
39	0.350695	0.0083	0.00048	0	0.00	0.38	0.7442
40	0.350695	0.01245	0	0	0.00	0.38	0.7479
41	0.350695	0.01245	0.00024	0	0.00	0.38	0.7481
42	0.350695	0.01245	0.00048	0	0.00	0.38	0.7484
43	0.350695	0.0166	0	0	0.00	0.38	0.7520
44	0.350695	0.0166	0.00024	0	0.00	0.38	0.7523
45	0.350695	0.0166	0.00048	0	0.00	0.38	0.7525

Anexo 16. Evaluación estadística de costos promedios para el establecimiento de rosa miniatura *in vitro*. El Zamorano, Honduras, 2000.

Medio	BAP (mg/l)	AIA (mg/l)	Costo Promedio (US\$)	P(F)
A	0.0	0.0	0.60 ^{ab}	0.0001
A	0.0	0.1	0.49 ^{ab}	
A	0.0	0.2	0.50 ^{ab}	
A	0.5	0.0	0.43 ^{ab}	
A	0.5	0.1	0.35 ^{ab}	
A	0.5	0.2	0.61 ^{ab}	
A	1.0	0.0	0.19 ^a	
A	1.0	0.1	0.35 ^{ab}	
A	1.0	0.2	0.42 ^{ab}	
A	1.5	0.0	0.23 ^a	
A	1.5	0.1	0.41 ^{ab}	
A	1.5	0.2	0.51 ^{ab}	
A	2.0	0.0	0.30 ^a	
A	2.0	0.1	0.41 ^{ab}	
A	2.0	0.2	0.55 ^{ab}	
B	0.0	0.0	0.83 ^{bc}	
B	0.0	0.1	0.68 ^{bc}	
B	0.0	0.2	0.96 ^{bc}	
B	0.5	0.0	0.36 ^{ab}	
B	0.5	0.1	0.28 ^a	
B	0.5	0.2	0.48 ^{ab}	
B	1.0	0.0	0.26 ^a	
B	1.0	0.1	0.30 ^a	
B	1.0	0.2	0.26 ^a	
B	1.5	0.0	0.23 ^a	
B	1.5	0.1	0.37 ^{ab}	
B	1.5	0.2	0.35 ^{ab}	
B	2.0	0.0	0.44 ^{ab}	
B	2.0	0.1	0.22 ^a	
B	2.0	0.2	0.31 ^a	
C	0.0	0.0	2.00 ^{cd}	
C	0.0	0.1	0.83 ^{bc}	
C	0.0	0.2	1.91 ^c	
C	0.5	0.0	1.06 ^c	
C	0.5	0.1	1.60 ^{cd}	
C	0.5	0.2	1.09 ^{cd}	
C	1.0	0.0	2.48 ^f	
C	1.0	0.1	1.59 ^{cd}	
C	1.0	0.2	1.36 ^{cd}	
C	1.5	0.0	1.35 ^{cd}	
C	1.5	0.1	1.03 ^{bc}	
C	1.5	0.2	0.90 ^{bc}	

...Anexo 16 continuado.

C	2.0	0.0	1.19 ^{ab}	
C	2.0	0.1	1.04 ^c	
C	2.0	0.2	1.47 ^d	

CV% = 64.37

+Prueba D.M.S.

^{ab} Medias con igual letra no difieren estadísticamente ($P < 0.1$).

Anexo 17. Evaluación económica: costos mínimos para el establecimiento de rosa miniatura *In vitro*, El Zamorano, Honduras, 2000.

Medio	Brote Estandar Promedio	Costo Promedio	Clasificación
	Unidades	US\$	
37	0.18	2.48	Dominado
33	0.22	1.91	Dominado
43	0.22	1.19	Dominado
16	0.26	0.83	Dominado
35	0.26	1.60	Dominado
31	0.27	2.00	Dominado
12	0.27	0.51	Dominado
39	0.28	1.36	Dominado
38	0.29	1.59	Dominado
2	0.31	0.49	Dominado
18	0.33	0.96	Dominado
42	0.38	0.90	Dominado
17	0.38	0.68	Dominado
45	0.38	1.47	Dominado
1	0.38	0.60	Dominado
6	0.41	0.61	Dominado
11	0.42	0.41	Dominado
40	0.43	1.35	Dominado
44	0.44	1.04	Dominado
3	0.45	0.50	Dominado
36	0.48	1.09	Dominado
41	0.49	1.03	Dominado
27	0.51	0.35	Dominado
4	0.52	0.43	Dominado
15	0.56	0.55	Dominado
34	0.59	1.06	Dominado
21	0.62	0.48	Dominado
8	0.65	0.35	Dominado
9	0.67	0.42	Dominado
32	0.68	0.83	Dominado
7	0.71	0.19	Dominante
24	0.74	0.26	Dominado
5	0.80	0.35	Dominado
26	0.85	0.37	Dominado

...Anexo 17 continuado.

23	0.89	0.30	Dominado
10	0.97	0.23	Dominado
13	1.01	0.30	Dominado
28	1.06	0.44	Dominado
25	1.09	0.23	Dominado
30	1.09	0.31	Dominado
14	1.13	0.41	Dominado
20	1.20	0.28	Dominado
19	1.26	0.36	Dominado
22	1.33	0.26	Dominado
29	1.35	0.22	Dominante