FACULTAD DE INGENIERIA Y CIENCIAS APLICADAS

# EVALUACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES SIGNIFICATIVAS PARA LA FLORACIÓN *IN VITRO* DE HÍBRIDOS DE MINI ROSA

(*Rosa x Híbrida*)

AUTORA

Ángela Sofía Chávez Guevara

AÑO

2020

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

# EVALUACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES SIGNIFICATIVAS PARA LA FLORACIÓN *IN VITRO* DE HÍBRIDOS DE MINI ROSA (*ROSA X HÍBRIDA*)

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos para optar por el título de

Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

MSc. Fernando Xavier Rivas Romero

Autora

Ángela Sofía Chávez Guevara

Año

2020

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Evaluación e identificación de variables significativas para la floración *in vitro* de híbridos de mini rosa (*Rosa x Híbrida*), a través de reuniones periódicas con la estudiante Ángela Sofía Chávez Guevara, en el semestre 202010, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Fernando Xavier Rivas Romero

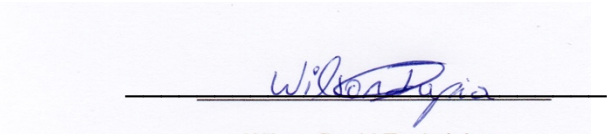
Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular

de Plantas

C.I. 171809270-1

**DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR**

"Declaro haber revisado este trabajo, Evaluación e identificación de variables significativas para la floración *in vitro* de híbridos de mini rosa (*Rosa x Híbrida*), de la estudiante Ángela Sofía Chávez Guevara, en el semestre 202010, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



Wilson David Tapia López

Máster en Gestión y Planificación Ambiental

C.I. 171420528-1

**DECLARACIÓN DE AUTORIA DEL ESTUDIANTE**

“Declaro que este trabajo es original, de autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”

Ángela Sofía Chávez Guevara

C.I. 171868863-1

**AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a todas las personas importantes en mi vida que formaron parte de esta travesía.

A Fernando Rivas por guiarme en el desenvolvimiento de este trabajo y darme la oportunidad de profundizar mis conocimientos en el área de biotecnología vegetal.

A la Universidad de Las Américas por brindarme las herramientas necesarias para realizar mi trabajo de investigación.

## DEDICATORIA

En los últimos años la vida me ha enseñado a caminar sin hacer mucho ruido, buscar siempre nuevos desafíos, celebrar las pequeñas conquistas y ser humilde con mi conocimiento, sin dejar de lado la introspección constante. En este trabajo se ve reflejado mi esfuerzo, perseverancia y mi afición por la biotecnología vegetal. Por esta y mil razones más este trabajo lo dedico a mis padres.

Los amo eternamente

**RESUMEN**

La rosa es una planta leñosa y arbustiva, originada principalmente en zonas tropicales y templadas. Alrededor del mundo, las variedades de rosa más representativas son: Rosales Híbridos de Té, Rosas Grandiflora y Rosales Floribunda. La introducción del género *Rosa* a Ecuador es parcialmente desconocida, pero se deduce que fue traída por los colonizadores de América. El cultivo de rosas en Ecuador ha generado impacto en el mercado comercial de la floricultura nacional, debido a su atractivo visual y diversidad de colores. Además, debido a los beneficios de sus principios activos, la rosa se ha convertido en un modelo vegetal de investigación en el campo de la fitoquímica. En la actualidad la producción florícola de rosas que se desarrolla en invernadero presenta varios inconvenientes; uno de ellos y el más importante es el tiempo de producción floral que oscila entre los 7 a 8 meses, sin incluir el tiempo de pre y post cosecha. Es por ello que se hace necesario estudiar el proceso de floración bajo condiciones controladas, como lo es el mecanismo de floración *in vitro.* En el presente estudio se plantea estandarizar las condiciones de cultivo para la floración *in vitro* de híbridos de mini rosa, mediante el diseño experimental Plackett Burman. Los resultados obtenidos determinaron como variable significativa al fotoperiodo con respecto al "Tiempo de aparición de botones florales" y la interacción del fotoperiodo, el nitrato de amonio ($NH_4NO_3$) y el ácido naftalenacético (ANA) en el medio de cultivo con relación al "Número de botones florales". Asimismo, se observó la incidencia favorable de un período de vernalización previo al período de floración. Finalmente, se determinó que las condiciones óptimas para la floración *in vitro* de híbridos de mini rosa son: un pre tratamiento de al menos 24 h de vernalización a una temperatura de 5ºC; un fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad; una concentración de 0,225 mg $L^{-1}$ de $NH_4NO_3$ y una concentración de 0,1 mg $L^{-1}$ de ANA en el medio de cultivo para obtener la primera estructura floral en 21 días y un 78,49% de floración *in vitro* de híbridos de mini rosa.

**ABSTRACT**

The rose is a woody and shrubby plant, originated mainly in tropical and temperate zones. The most representative varieties of rose are: Hybrid Tea Roses, Grandiflora Roses and Floribunda Roses. The introduction of the genus *Rosa* to Ecuador is partially unknown, but it deduces was brought by the colonizers of America. The cultivation of roses in Ecuador has generated an impact on the commercial market of national floriculture, due to its visual appeal and diversity of colors. In addition, the benefits of its active ingredients, rose has become a plant research model in the field of phytochemistry. Actually, the floricultural production of roses that develops in the greenhouse has several drawbacks; one of them is the production time of flowers that ranges from seven to eight months, not including the pre and post treatment time. That is why it is necessary to study the flowering process under controlled conditions, such as the *in vitro* flowering mechanism. In the present study, it is proposed to standardize the culture conditions for the *in vitro* flowering of mini rose hybrids, using the experimental design Plackett Burman. The results obtained determined as a significant variable the photoperiod respect to the "Time of appearance of flower buds" and the interaction of the photoperiod, ammonium nitrate ($NH_4NO_3$) and naphthaleneacetic acid (ANA) in the culture media, proved significant in relation to the "Number of flower buds". Likewise, the favorable incidence of a vernalization period promote *in vitro* flowering. Finally, it was determined that the optimal conditions for *in vitro* flowering of mini rose hybrids are a pretreatment of at least 24 h of vernalization at a temperature of 5ºC, a photoperiod of 12 h of light and 12 h of darkness, a concentration of 0,225 mg $L^{-1}$ ($NH_4NO_3$) and a concentration of 0,1 mg $L^{-1}$ (ANA) in the culture media to obtain 78,49% of in vitro flowering of mini rose hybrids.

# ÍNDICE

# 1.CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes

La floración es la etapa del desarrollo vegetal que inicia con la fase reproductiva de la planta. Esta se presenta en un estadío específico con una acumulación de nutrientes y de reservas energéticas con el objetivo de iniciar el proceso de diferenciación floral. El mecanismo de floración es influenciado principalmente por las condiciones ambientales. Según Azcón (2008), las plantas han desarrollado un sistema de control especializado para inducir la etapa de floración en un período que propicia la reproducción vegetal, asegurando así la supervivencia de la especie. El fotoperiodo, es decir, someter a la planta a una intensidad de luz específica durante un tiempo prolongado y la vernalización como un estrés que generan las bajas temperaturas como la vernalización inducen la floración y fructificación en distintas especies vegetales (Azcón-Bieto & Talón, 2008; King, Moritz, Evans, Junttila, & Herlt, 2001; Laurie, 2004; Montero-carmona et al., 2009; Roque et al., 2016).

El desarrollo floral está regulado principalmente por tres clases de genes; los de identidad del órgano floral los cuales se encargan de generar la expresión génica de aquellos órganos relacionados con la floración de la planta, genes catastrales que desarrollan el papel regulador de los órganos florales  y de identidad del meristemo que son necesarios para la inducción floral a nivel de tejido (Taiz & Zeiger, 2008). Desde un punto de vista epigenético, el proceso de floración se encuentra regulado por estímulos endógenos (regulación hormonal) y exógenos (temperatura). La regulación hormonal, la señalización y homeostasis celular son de vital importancia para la floración en la planta. Algunas hormonas de la planta como giberelinas, ácido abscísico y auxinas juegan un papel importante en la compactación de la cromatina por causa de metilación del ADN y las modificaciones postraduccionales de las histonas (Campos-Rivero et al., 2017).

La transición de la identidad meristemática, de vegetativa a reproductiva es un proceso que está marcado por una alta tasa de división celular en la parte central del meristemo apical de la planta. El proceso de engrosamiento en la zona central del meristemo se caracteriza por ciclos de división celular lenta; generando una incapacidad de florecimiento frente a estímulos ambientales y hormonales. Es por ello que se hace necesario desarrollar mecanismos que permitan promover la respuesta a estímulos inductivos a la floración. Existen varios mecanismos plenamente identificados y existen otros que están en proceso de dilucidación. Sin embargo, al ser un fenómeno controlado por muchos factores, tanto internos, como externos mencionados con antelación, también se hace necesario el conocimiento de este proceso bajo condiciones muy controladas. Uno de estos mecanismos es el de floración *in vitro*, técnica por la cual se pueden evaluar los factores químicos y físicos que estimulen la etapa reproductiva de la planta a través del cultivo *in vitro* de tejidos en condiciones controladas de laboratorio (Campos-Rivero et al., 2017; Taiz & Zeiger, 2008).

Uno de los primeros trabajos de investigación realizados acerca de la inducción floral *in vitro* fue realizado en el laboratorio de fisiología de plantas de la Universidad de Liége en Bélgica en algunas especies del género *Orchidaceae*, el cual se basó en un análisis fisiológico del proceso de floración *in vitro.* Se determinaron los factores más influyentes en el desarrollo floral *in vitro* entre ellos: el estado fisiológico de la planta madre, un período de vernalización artificial, la temperatura y el fotoperiodo. A la par, en la Universidad de Natal en Sudáfrica se desarrolló una investigación para determinar los factores que pueden promover o inhibir la floración *in vitro*, en los géneros vegetales *Nicotiana* y *Kalanchoe*. Mediante un trabajo experimental de bioensayos se analizó el estado fisiológico de la planta madre, el medio de cultivo y el fotoperiodo para detectar el efecto que tienen las fitohormonas, los nutrientes y compuestos fenólicos durante el desarrollo floral *in vitro*. Los resultados obtenidos determinaron que la suplementación de auxinas, citoquinas y algunas giberelinas en el medio de cultivo pueden promover la inducción floral *in vitro* de *Nicotiana*.

En el caso de *Kalanchoe*, se evidenció que la inhibición de la floración *in vitro* puede ser causada por una sustancia con concentraciones elevadas de nitratos desprendida por sus hojas jóvenes. Los compuestos fenólicos que promueven el desarrollo vegetativo durante el crecimiento y multiplicación de la planta en condiciones controladas pueden provocar un efecto adverso como la reducción en la diferenciación celular durante el proceso de floración *in vitro* (Dickens & van Staden, 1988; Kamboj & Saluja, 2010).

La rosa es una planta ornamental, leñosa y perenne que se desarrolla en lugares con clima templado. Existen alrededor de 300 variedades provenientes de Asia, Europa y el Noroeste de África (Goody, 1993). La rosa miniatura es una variedad del género *Rosa* obtenida por varios procesos de hibridación. Se caracteriza por ser una planta pequeña y arbustiva; sus flores se diferencian debido a sus múltiples formas, colores y tamaños. Además de ser un atractivo estético y comercial (Philips & Rix, 2004; Verdugo & Andrade, 2018).

Debido a los beneficios de sus principios activos, la rosa se ha convertido en los últimos años, en un modelo vegetal de investigación en el campo de la fitoquímica. En el campo de la dermatología y cosmética se han desarrollado varias investigaciones acerca de su potencia regeneradora en la dermis y diversas afecciones tópicas, incluso se ha implementado una fórmula química aceitosa a partir de rosa para el tratamiento de estrías durante el embarazo (Hernández Pérez, & Mir Ramos, 2013). Debido al gran interés comercial que el género *Rosa* representa a nivel mundial se han desarrollado investigaciones acerca de su código genético, para conocer aquellos genes relacionados con el marchitamiento de los botones florales. De esta manera se podría aumentar el tiempo de duración de botones florales e incluso desarrollar nuevas variedades que requieran una menor cantidad de agua para su desarrollo morfológico y vegetativo (Azón López, Hernández Pérez, & Mir Ramos, 2013; Castilla, 2005).

En cuanto a la floración *in vitro* de la rosa, se han impulsado algunas investigaciones en este campo, sin embargo, son escasas. En el instituto molecular de Agro biología de la Universidad de Singapur se realizó una investigación acerca de la inducción floral *in vitro* de rosas, en el que se provocó la floración en plántulas micropropagadas en un medio Murashige and Skoog (MS), modificado con los elementos orgánicos de Gamborg (G5), mioinositol y distintas combinaciones de fitohormonas como: 6 benzilaminopurina (6-BAP), ácido naftalenacético (ANA), Thidiazuron (TDZ), Zeatina (ZT). Las concentraciones de fitohormonas que obtuvieron un alto porcentaje de inducción floral *in vitro* (44,9%) fueron: 0,5 mg $L^{-1}$ de TDZ (2,27 $\mu$M) y 0,1 mg $L^{-1}$ de ANA (0,54 $\mu$M) (Wang, Yuan, & Hong, 2002).

En la Universidad de Songkble en el 2009 se realizó una investigación acerca de la floración *in vitro* de rosa (*Rosa x híbrida L.*) a partir de explantes nodales con la obtención de cinco brotes por explante en un medio de multiplicación MS basal suplementado con 3,0 mg $L^{-1}$ de 6-BAP y 1 mg $L^{-1}$ de kinetina durante la etapa de multiplicación vegetativa. Posterior a nueve semanas en una etapa de floración los explantes se encontraban en un medio MS basal suplementado con 2,0 mg $L^{-1}$ de 6-BAP en una etapa de floración, obteniendo un 50% de floración con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad (Kantamaht Kanchanapoom, Jingjit, & Kanchanapoom, 2011; Kane, Johnson, & Kauth, 2008).

El grupo de investigación liderado por Vu Hong realizó una investigación sobre la influencia de una fuente de carbono como la sacarosa en relación a distintas concentraciones de citoquinas durante el proceso de floración *in vitro*. La investigación se realizó en la *Rosa x híbrida*, variedad “First Prize”. Se determinó que la sacarosa puede ser el factor clave para la inducción floral *in vitro*, con un 45% de floración en un medio MS suplementado con 3,0 mg $L^{-1}$ de 6-BAP, 1,0 mg $L^{-1}$ de ANA y 30 g $L^{-1}$ de sacarosa. Además, se planteó la hipótesis que las sales orgánicas como el amonio en el medio de cultivo MS basal pueden afectar la floración *in vitro*. En efecto, la reducción en la concentración de amonio en el

medio de cultivo promueve la floración *in vitro* (Vu, Anh, & Nhut, 2006; Zeng et al., 2013).

## 1.2 Planteamiento del problema

En la actualidad la producción florícola en campo que se desarrolla en invernadero presenta varios inconvenientes; uno de ellos es el tiempo de producción floral de la rosa que oscila entre los 7 a 8 meses, sin incluir el tiempo de pre y post tratamiento del suelo, tiempo significativo en la producción vegetal. De la misma forma, el abuso de agroquímicos en la producción florícola tiende a acidificar o alcalinizar el suelo evitando la biodisponibilidad de nutrientes esenciales para el desarrollo vegetativo, impidiendo así su absorción. Los cambios drásticos de temperatura e intensidad de luz a los que el cultivo de rosas se encuentra expuesto en campo, debido al efecto invernadero, alteran el tiempo de inducción floral en las rosas, generando una mala calidad de la flor. Uno de los principales exportadores de rosas a nivel mundial es el Ecuador, por ende se necesita del control en las condiciones de cultivo, los estudios *in vitro* de floración no son significativos, por ende, carecen de reproducibilidad. (Cancino-Escalante, Quevedo García, Villamizar, & Díaz Carvajal, 2015; Koncsak, 2008).

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 General

Estandarizar las condiciones de cultivo de tejidos para la floración *in vitro* de híbridos de mini rosa.

### 1.3.2 Específicos

- Determinar condiciones específicas de cultivo, para la introducción y multiplicación vegetal *in vitro* de híbridos de mini rosa.
- Identificar las variables significativas que intervienen en la floración *in vitro* de híbridos de mini rosa.
- Obtener un cultivo óptimo para la floración *in vitro* de híbridos de mini rosa en función de variables significativas.

## 1.4 Justificación

Identificar plenamente la influencia positiva o negativa de los factores más representativos involucrados en la floración in vitro es importante, pues ayudaría a determinar el efecto específico de esas condiciones en un hipotético ambiente.

En la actualidad, la información académica reportada sobre la floración *in vitro* de especies vegetales está desarrollada en base a la experimentación "prueba y error". Este tipo de información no tendría mucho aporte en este hipotético ambiente productivo, debido a variaciones en las condiciones de cultivo de esta especie. Mediante la implementación de un diseño experimental, basado en minería de datos de resultados positivos de floración *in vitro*, nos permitiría una identificación preliminar de las posibles variables más significativas relacionadas con la floración *in vitro*. Al reportar la descripción de éstas en ambientes controlados, se podría experimentar en campo, controlando únicamente estas condiciones, con el objetivo de buscar mecanismos para reducir el tiempo de aparición de botones florales y por consiguiente, la apertura floral más temprana en condiciones de producción. La obtención de resultados positivos en la floración *in vitro* puede ser un punto de partida para la extrapolación a campo de la agricultura (Kurokura, Mimida, Battey, & Hytönen, 2013; Yadav & Singh, 2011).

En el Ecuador la estructura que recubre las hectáreas de invernaderos florícolas en su gran mayoría son de distintos tipos de plástico; material que se caracteriza por ser un gran conductor térmico, fomentando así una inestabilidad en la temperatura, es decir, bajas en el suelo y altas en la parte aérea de la planta. El desbalance de temperatura en el invernadero genera inestabilidad en su desarrollo morfológico. Mediante el cultivo *in vitro* se logra obtener una estabilidad de temperatura en el ambiente como en el medio de cultivo, de esta manera se puede asegurar que las condiciones externas permanezcan estables para el desarrollo morfológico de la planta. Además, con una investigación

exhaustiva acerca de la especie vegetal con la que se realice el trabajo de experimentación en este caso híbridos de mini rosa se puede determinar parámetros específicos y adecuados para obtener un alto porcentaje de crecimiento y diferenciación vegetal, asegurando así un gran porcentaje de éxito durante la experimentación. Adicionalmente, la variabilidad de especies de rosas que existen en la actualidad derivan de varios procesos de hibridación dando origen alrededor de 25.000 variedades; es así que se han desarrollado varias técnicas de cultivos de tejidos para obtener un alto coeficiente de multiplicación vegetativa. Sin embargo, el conocimiento acerca de las técnicas de cultivo *in vitro* en el género *Rosa* no es representativo para su reproducibilidad en el ámbito experimental, por lo tanto, es primordial generar bases de información que puedan dar lugar a grandes investigaciones acerca del cultivo *in vitro* de la rosa (King et al., 2001; Nak-Udom, Kanchanapoom, & Kanchanapoom, 2009).

Finalmente, la floración *in vitro* de modelos vegetales podría ser base para la investigación de la mejora genética a partir de cultivo de anteras, técnica por la cual se obtienen individuos haploides (Koncsak, 2008). Un valor adicional para el presente trabajo de titulación es el área comercial. La distribución de flores obtenidas *in vitro* de híbridos de mini rosa podría representar un producto llamativo y fuera de lo convencional, ya que se utilizaría material vegetal en un envase de vidrio llamativo a la vista para recuerdos, presentes e incluso decoraciones para eventos.

# 2. CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

## 2.1. Importancia del género *Rosa*

Una de las plantas ornamentales con mayor demanda en el mercado mundial es la rosa, debido a su atractivo visual, variedad de formas y colores. La rosa es una planta leñosa y perenne cultivada a gran escala. La importancia del cultivo de rosas en Ecuador ha sido priorizada en el mercado comercial de la floricultura

nacional. Este sector tiene mucha influencia en la economía del país, ya que promueve el ingreso de divisas, a la par que genera numerosos puestos laborales. Por otra parte, Ecuador es el tercer país con mayor tasa de exportación de rosales en Sudamérica, debido a la ubicación geográfica, las rosas ecuatorianas poseen características morfológicas diferenciales en el mercado (COPREI-CICO, 2009; Mikanagi, Saito, & Yokoi, 2000).

Alrededor del 25% de las especies representativas del género *Rosa* provienen de Turquía. Las distintas especies de rosa han sido obtenidas por procesos continuos de selección a lo largo del tiempo e hibridaciones, generando alrededor de 300 variedades de rosas. Las características más apreciadas de las rosas en el mercado mundial son; el tiempo de duración en el florero posterior al corte, alto número de inflorescencias, el grosor del tallo y el tamaño de botón floral según la variedad vegetal (Cherri-martin, 2007; Pati, Rath, Sharma, Sood, & Ahuja, 2006).

En los últimos años, ha trascendido el cultivo de rosas en el campo farmacológico, ya que se han encontrado sustancias antiinflamatorias y radio protectoras en algunos de sus extractos vegetales, que favorecen el correcto funcionamiento del cuerpo humano. El tallo, la flor, las hojas y la raíz de rosales son usadas para la obtención de aceites esenciales para tratar algunas alteraciones dérmicas y como esencias en la perfumería. Además, posee varias vitaminas, flavonoides en alta cantidad, ácido cítrico, málico y taninos. Los frutos deshidratados o secos de esta especie se utilizan para la elaboración de té (Castilla, 2005; Ercisli, 2005; Ignacio & Diaz, 2017; Uggla, Gao, & Werlemark, 2003).

## 2.2. Características del género *Rosa*

La rosa se originó en zonas subtropicales y templadas ubicadas en el hemisferio norte. Alrededor de 100 especies identificadas se distribuyen en Europa, Asia y Norte América. La mayor cantidad de especies silvestres se encuentran en Asia

Central. La introducción del género *Rosa* a Ecuador es parcialmente desconocida, pero se deduce que fue traída por los colonizadores de América; siendo cultivada primordialmente de manera decorativa en jardines. En la Tabla 1 se puede apreciar la división taxonómica de la rosa (Ercisli, 2005; Yong, 2004).

Tabla 1.

*División taxonómica del género Rosa*

| | |
|---|---|
| **Reino** | *Plantae* |
| **Filo** | *Tracheophyta* |
| **Clase** | *Magnoliopsida* |
| **Subclase** | *Rosidae* |
| **Orden** | *Rosales* |
| **Familia** | *Rosaceae* |
| **Género** | *Rosa* |

Tomado de (Arctos, 2017)

Morfológicamente la rosa es una planta leñosa y arbustiva (Figura 1A). Su altura oscila entre 5 y 20 m, dependiendo de la variedad vegetal. La raíz es poca profunda, debido a su forma de reproducción, por estaca y esquejes; su raíz llega a pesar alrededor del 5 al 10% del peso total de la planta. En el caso de los injertos, las raíces suelen ser profundas, favoreciendo así la floración del rosal (Figura 1B). El tallo semileñoso del rosal posee protuberancias en la dermis denominada estípula, como vestigio de la evolución, cumpliendo varias funciones en la naturaleza (Figura 1C). Las hojas son pinnadas, con nervaduras sobresalientes en el envés; presentan estructuras en forma de “aguijones” en el borde (Figura 1D). Esto puede depender de su estado de adaptación al medio geográfico en el que se encuentra. Las flores se caracterizan por ubicarse en la parte apical terminal de la planta, con una inflorescencia mono flora o multiflora

terminal. A nivel morfológico son hermafroditas, periantadas, con cáliz dialisépalo con cinco piezas; con sépalos morfológicamente simples o complejos de color verde; corola dialipétala, formada por un número indeterminado de pétalos de colores variados, androceo compuesto por estambres proporcionales al número de pétalos, gineceo formado por pistilos (Figura 1E). Algunas variedades de rosa poseen fruto, más conocido como aquenio, que posteriormente se transformará en una infrutescencia conformada por múltiples aquenios secos provistos de una separación entre ellos y encerrados en el hipanto, que es una especie de envoltura carnosa (Figura 1F). Las semillas tiene escaramujo, capa externa que cubre la pulpa interna (Figura 1G) (Arévalo et al., 2011; Yong, 2004).

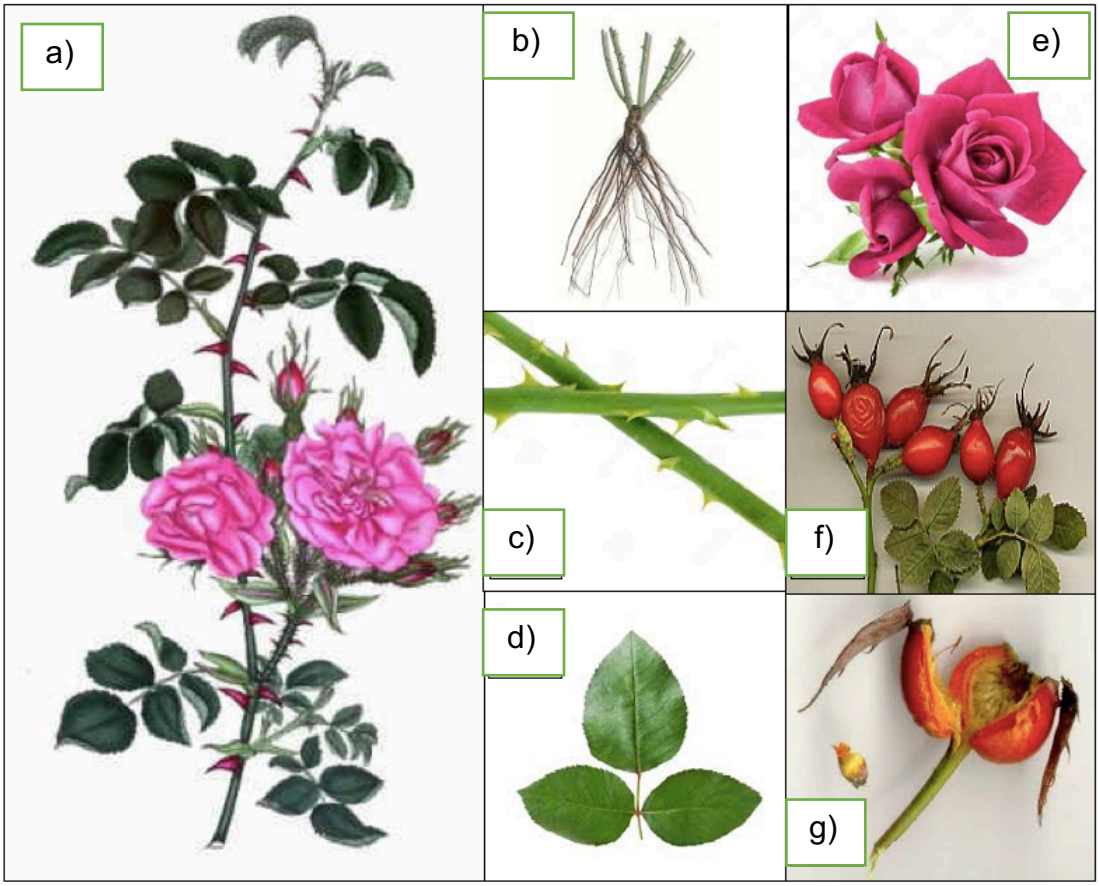



*Figura 1*. Estructura morfológica del género *Rosaceae*

Tomado de (Burnie, 2013)

a) Estructura morfológica de la rosa.

b) Raíz;

c) Tallo;

d) Hojas jóvenes;

e) Flor;

f) Aquenio y

g) Semilla.

## 2.3. Variedad *Rosa x Híbrida*

Existe algunas clases de rosales; sin embargo, los más significativos son Rosales Floribunda, Rosales Grandiflora e Híbridos de Té.

### 2.3.1. Rosal Floribunda

La clase Floribunda se caracteriza por una inflorescencia perfecta y en panícula como se visualiza en la Figura 2, heredada de sus antecesores Híbridos de Té y Polyanta. Este tipo de rosal suele clasificarse de acuerdo al tamaño: “Rosal Floribunda enano”, “Mediano” y “Grande” que pueden llegar a una altura de 4 cm, entre 60 y 61 cm y 1 m respectivamente. El rosal Floribunda florece en otoño con sus flores en forma de corimbo (Cherri-martin, 2007; Raina et al., 2012).

*Figura 2*. Variedad Rosal Floribunda

Tomado de (Wirecard Bank, 2019)

### 2.3.2. Rosal Grandiflora

El grupo de rosales grandifloras es resultado de un cruce entre el Rosal Híbrido de Té y Rosal Floribunda, obtenido en Estados Unidos por un conjunto de agricultores. Este grupo de rosales posee características distintivas en sus inflorescencias como se muestra en la Figura 3, con flores pequeñas y agrupadas con un alto vigor durante los primeros años de cultivo. La coloración y tiempo de duración de la inflorescencia son los principales atractivos de este grupo en el campo de la jardinería (Cherri-martin, 2007; Raina et al., 2012).

*Figura 3*. Variedad Rosal Grandiflora

Tomado de (Burnie, 2013)

**2.3.3. Híbrido de Té**

El rosal Híbrido de Té es el que se empleó en el presente estudio. Esta variedad se deriva de un cruzamiento entre un rosal chino y uno europeo. Caracterizado por una inflorescencia intermitente como se muestra en la Figura 4, colores variados, longitud de tallo estandarizado y sobre todo una larga vida en florero posterior a su corte. El aroma no es tan penetrante como el de sus progenitores. Alrededor del 80% de cultivos de esta variedad de rosa se encuentra en la parte central de Asia. Este tipo de rosal es sensible al frío y posee la característica de florecer dos veces en el año (Cherri-martin, 2007; Raina et al., 2012).

*Figura 4*. Variedad Rosa Híbrido de té

Tomado de (Phillips & Rix, 2009)

## 2.2. Proceso de floración vegetal

El proceso de floración vegetal inicia con un cambio morfológico en los meristemos, producido por estímulos tanto internos como la regulación hormonal y externos como el fotoperiodo. La presencia de células en estado de dormancia en el crecimiento vegetativo generan cambios para fomentar la formación de la flor (Bidwell, 1979).

### 2.2.2. Genética de la floración

La regulación de expresión génica en la floración vegetativa se ve principalmente influenciada por el metabolismo del azúcar y la acción de hormonas endógenas. La presencia del ácido giberélico inhibe la floración en la rosa. La Giberelina 2-oxidasa (GA2ox) y el factor de transcripción *SCL13* se regulan con la disminución de giberelinas en la planta, promoviendo la transición de meristemo vegetativo a floral (Guo et al., 2017).

La presencia de auxinas tiene una relación positiva con la expresión génica durante la transición floral en el género *Rosaceae*. El ácido abscísico regula pasivamente la transición floral en el metabolismo de la glucosa que fomenta una señal para la floración. La expresión de la proteína FRIGIDA (FRI), los genes de identidad meristemática *LEAFY* (FY), *COP1*, los genes que controlan la activación floral *DMR1*, *ELIP*, *COL16* están relacionados con los cambios fisiológicos que se presentan en el ritmo circadiano en plantas, regulan de manera positiva y colectiva la transición floral en la rosa. Los genes *DGE*s poseen un mecanismo molecular de mediación en la regulación de la transición floral (Kurokura et al., 2013).

Los mecanismos moleculares que controlan la floración estacional de *Rosacea* se ven influenciados por factores externos como la temperatura y el fotoperiodo. El regulador *TERMINAL FLOWER1 (TFL1)* es aquel que se encarga de regular la transición de estadíos vegetativos de la planta hasta los reproductivos (Olszyk et al., 2017).

### 2.2.3. Condiciones para el estímulo de la floración

Para el establecimiento, desarrollo y floración de la rosa es necesario tener varias condiciones que favorezcan su adaptabilidad. La temperatura puede acelerar el crecimiento de la planta y favorecer a las características fenotípicas de la rosa, las fluctuaciones de temperatura en el ambiente también pueden provocar un efecto negativo en el desarrollo vegetativo. Los rangos más habituales de temperatura oscilan entre los 17 a 25ºC y resultan adecuados para el desarrollo de la planta. Sin embargo, depende el estadío vegetativo en el que se encuentre la planta para aumentar o disminuir la temperatura y así fomentar la transición de meristemos en la planta. Durante el proceso de floración la intensidad de luz debe aumentar para favorecer a la apertura floral, los fotoperiodos son necesarios para la aparición de las estructuras pre florales con una etapa luminosa (21 a 24ºC) y una etapa oscura (15 a 16ºC). Una adecuada humedad ambiental (70 a 80%) fomenta un incremento en la superficie foliar de la rosa. Sin embargo, el exceso de humedad propicia la aparición de agentes

infecciosos. La cantidad de dióxido de carbono también es una exigencia climática preponderante, ya que es una molécula importante en varios procesos bioquímicos de la planta como lo es la fotosíntesis, en el caso de la rosa. La concentración adecuada de $CO_2$ ha demostrado un efecto de tolerancia a la salinidad. La época y tipo de multiplicación vegetativa intervienen en el desarrollo de la rosa. El género *Rosa* puede desarrollarse en cualquier época del año; sin embargo, la mejor oscila entre septiembre y marzo (Yong, 2004).

## 2.3. Floración *in vitro*

El uso de herramientas biotecnológicas como la floración *in vitro* de algunas especies vegetales genera una ventaja para la manipulación genética, resistencia a plagas y ataques infecciosos, disminuye el tiempo de floración y genera varios avances en el campo de la floricultura. La floración *in vitro* promueve un modelo de estudio con condiciones controladas, analiza factores externos que inducen o reprimen la floración vegetal (Figura 5). Además, permite comprender el proceso fisiológico de floración y estudiar la interacción de factores exógenos y endógenos encargados de promover la floración. El estadío vegetativo de la planta y la especie interfieren en la floración *in vitro*; es necesario determinar dichos factores durante la experimentación en condiciones controladas (Mohamed, Taha, Razak, & Elias, 2018).

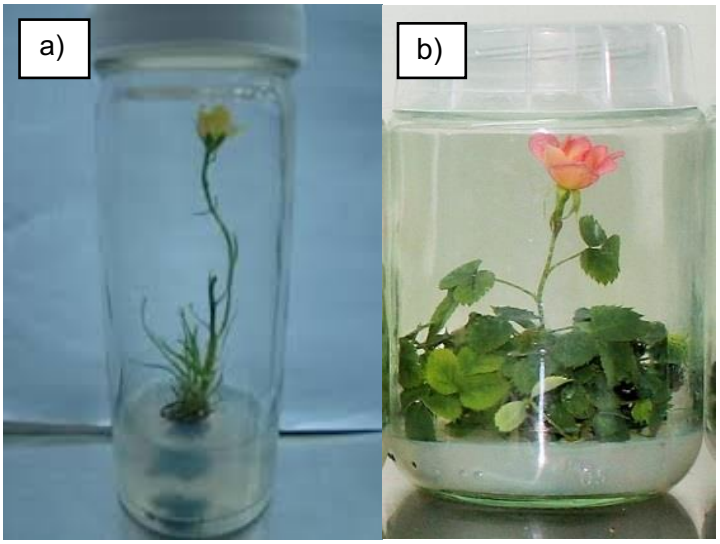



*Figura 5*. Floración *in vitro*

Tomado de (Asociación Española de plantas carnívoras, 2019; Kardavan, 2015).

a) *Drosophyllum* spp,

b) Híbridos de mini rosa (*Rosa x Híbrida*).

### 2.3.1. Aspectos generales

La floración *in vitro* ha sido la técnica más utilizada de la micropropagación *in vitro* para obtener plantas ornamentales con un especial atractivo en sus flores. Se ha evidenciado que los factores que promueven la transición del meristemo apical en floral son; la madurez de la planta, temperatura e intensidad de luz durante el fotoperiodo. Se han realizado varios trabajos de investigación para analizar el desarrollo fisiológico de la planta manteniendo factores externos significativos controlados (Murthy & Rao, 2012a).

La influencia hormonal tiene la capacidad de fomentar o inhibir la transición floral mediante la señalización química, emitiendo una respuesta fisiológica. Las citoquininas regulan el crecimiento de la planta, fomentan la división y diferenciación celular son precursores de la fase reproductiva. Las auxinas naturalmente tienen la función de elongación celular. Sin embargo, en la floración

*in vitro* representan un inhibidor de la floración. El estudio sinérgico entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo promueven a la floración. Las giberelinas tienen la función de redistribuir los fitorreguladores endógenos y terminar con la dormancia apical; así los meristemos cambian de estadío vegetativo a reproductivo. En concentraciones elevadas el nitrógeno en el medio de cultivo inhibe la transición floral en especies leñosas (Montero-Carmona et al., 2009; Teixeira Da Silva, Kerbauy, Zeng, Chen, & Duan, 2014).

### 2.3.2. Floración *in vitro* de especies ornamentales

Uno de los primeros estudios que se realizaron acerca de la inducción a la floración *in vitro* de especies ornamentales fue realizado en la universidad de Kioto en la especie *Phalaenopsis*. La hipótesis del estudio fue la relación de nitrógeno en el medio de cultivo y la transición floral del explante. Los resultados no fueron significativos para la inducción floral en *Phalaenopsis* ya que se obtuvo un 10% transición floral. Sin embargo, datos experimentales determinan que la temperatura fomenta dichos procesos, particularmente temperaturas superiores a 22 $^{o}$C (Duan & Yazawa, 1995).

La floración *in vitro* de orquídeas ha sido investigada a profundidad en la actualidad. Las orquídeas de manera natural florecen después de un tiempo prolongado posterior a su siembra, lo cual genera una desventaja en su producción. La experimentación se ha realizado con la implementación de distintos fitoreguladores al medio de cultivo. En el género *Dendrobium* se utiliza 6-BAP para fomentar la floración *in vitro* con un fotoperiodo de 16 h de luminosidad y 8 h de oscuridad. Con estas condiciones, se obtuvo un 72% de floración *in vitro* al cabo de seis meses de cultivo (Teixeira Da Silva et al., 2014).

Especies con atractivo comercial como *Guizotia abyssinica Cass* son de interés biotecnológico para aumentar la producción de aceites en su semilla. La floración *in vitro* de esta especie vegetal ayudará a obtener una mejoría en la calidad de la semilla y reducir el ciclo de reproducción. Para el cultivo utilizaron yemas

apicales y axilares; en el estadío de multiplicación se utilizó un medio MS con la adición de 6-BAP; para la etapa de floración se analizó el efecto sinérgico de 6-BAP y el ácido giberélico ($GA_3$) obteniendo resultados positivos con un 40% de inducción floral (Baghel & Bansal, 2014).

Las plantas leñosas como *Dendrocalamus hamiltonii* poseen dificultad morfológica en la formación de flores durante su desarrollo vegetal, debido a esto se ha estudiado un medio de cultivo propicio para la floración *in vitro* de esta especie. En el Instituto IHBT en India, han utilizado un medio MS modificado con citoquininas y auxinas con concentraciones específicas para obtener el desarrollo de la floración *in vitro*. Como resultados obtuvieron la formación de órganos reproductivos como androceo y gineceo. Además, la viabilidad de la formación del polen fue comparado con plantas desarrolladas en campo, obteniendo un mayor porcentaje en las plantas desarrolladas *in vitro*. Las condiciones ambientales controladas como el fotoperiodo y la temperatura de incubación en la floración *in vitro* influenciaron de manera directa a los resultados obtenidos (Kaur, Thapa, Sharma, Bhattacharya, & Sood, 2014).

En el año 2003 se estandarizó un protocolo para la floración *in vitro* de rosas a partir de yemas axilares. El ácido absísico, el ácido indol butírico (IBA) y 6-BAP se estudiaron en conjunto en el proceso de transición floral, los resultados determinaron que la utilización de ácido absísico inhibe la floración *in vitro* de la rosa con un índice de 15% de floración en 20 semanas posterior a su cultivo (Xiaohua et al., 2009).

La floración *in vitro* de *Rosa x híbrida* se ve influenciada por diversos factores exógenos como la temperatura del cultivo, el fotoperiodo y distintos subcultivos. En el estudio se analizó la interacción de fitoreguladores en el medio de cultivo con distintas concentraciones de sacarosa; se utilizaron las hormonas 6-BAP, AIA y ANA. Los resultados determinaron que la cantidad de sacarosa y ANA en

concentraciones específicas presentan un 68,33% de floración *in vitro* en 18 meses (Zeng et al., 2013).

El estudio de las citoquininas en la floración *in vitro* de la rosa “First Prize” han sido analizadas en el departamento de biotecnología en el instituto Viet Nghe Tinh. La experimentación se basó en la adición de 6-BAP, Thidiazuron (TDZ) y Zeatina (ZT) al medio de cultivo MS. Los resultados se basaron en el porcentaje de floración *in vitro* posterior a veinte y cuatro semanas de cultivo, con períodos constantes de subcultivos; éste fue de 49% en un medio de cultivo modificado con 6-BAP y ANA (Pati et al., 2006).

La etapa de floración *in vitro* en el género *Rosa* es estudiada actualmente debido al interés comercial hacia especies vegetales ornamentales. La experimentación se basa en el análisis del porcentaje de inducción floral *in vitro* dependiendo del tejido que se utilice para el cultivo. Las yemas apicales y axilares fomentan la floración *in vitro*; sin embargo, las yemas apicales reducen el tiempo de aparición floral en un medio enriquecido con sacarosa y 6-BAP. El subcultivo representa un factor importante para la inducción floral en el género (Xiaohua et al., 2009).

# 3. CAPITULO III. PROCEDIMIENTOS

## 3.1 Obtención del material vegetal

La planta madre utilizada en la experimentación es un híbrido de mini rosa (*Rosa x Híbrida*) obtenida mediante el cultivo por estaca en un invernadero en la localidad de Nayón, Provincia de Pichincha. Se realizó un período de aclimatación de la planta madre en el laboratorio de biotecnología vegetal (LQ34) de la Universidad de Las Américas durante 7 días.

La planta madre de híbrido de mini rosa cumplió las siguientes características: Alta densidad de yemas apicales, ausencia de plagas foliares, hojas verdes, definidas y una inflorescencia racimosa. La planta madre debe tener dos meses de crecimiento, como se muestra en la Figura 6. El tejido vegetal consistió en yemas apicales, ubicadas en la parte terminal de las ramificaciones de la planta. Posterior a la selección, se sometió a la planta madre a un período de vernalización, durante 48 h en completa oscuridad y una temperatura entre 3ºC y 5ºC.

*Figura 6*. Planta madre en el período de aclimatación

## 3.2 Validación de protocolos de propagación

Para la fase inicial de la propagación vegetal, se realizó una validación de protocolos estandarizados previamente en el laboratorio de biotecnología vegetal (LQ34) de la Universidad de Las Américas.

### 3.2.1 Desinfección superficial del material vegetal

El proceso de desinfección superficial vegetal comenzó con la inmersión de las yemas apicales en una solución de agua jabonosa durante 10 min. Luego las yemas apicales se sumergieron en una solución de etanol al 70%, durante 10 s,

posteriormente se sumergieron en una solución de cloro al 15%, con la adición de 40 µL de Tween 80% durante 10 min. Todos los procedimientos mencionados con antelación se llevaron a cabo con agitación constante. En cabina de flujo laminar se realizaron tres lavados sucesivos de agua destilada estéril de 5, 10 y 15 min, respectivamente.

### 3.2.2 Fase de establecimiento vegetal

La fase de establecimiento se realizó en un medio MS con una concentración de agar del 7 g $L^{-1}$, sacarosa con 30 g $L^{-1}$ y un pH de 5,6 a 5,7. La siembra de explantes se inició realizando cortes transversales en la parte superior e inferior, desechando las partes oxidadas y necrosadas del proceso de desinfección; luego se transfiere al medio de cultivo, ubicando la yema apical hacia arriba para permitir su crecimiento. Se incubaron los explantes bajo un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, con variaciones de temperatura de 28 y 23$^{o}$C, respectivamente. El tiempo para la fase de establecimiento fue de 7 días.

### 3.2.3 Fase de multiplicación vegetal

Previo al inicio de la fase de multiplicación, se realizó una segunda vernalización de los explantes establecidos. Las condiciones de temperatura oscilaron entre 3 5$^{o}$C durante 48 h en ausencia de luz. Durante la fase de multiplicación vegetal, se empleó un medio MS modificado, con agar en una concentración de 7 g $L^{-1}$, sacarosa 50 g $L^{-1}$, con 6-BAP 3 mg $L^{-1}$, ANA 1 mg. $L^{-1}$ y un pH de 5,8. Para el período de multiplicación, se transfieren los explantes hacia el medio de multiplicación vegetal. Los recipientes se incubaron bajo un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, con variaciones de temperatura de 28 y 23$^{o}$C, respectivamente durante 30 días.

## 3.3 Planteamiento de Pre ensayos para la floración *in vitro*

Los pre ensayos se llevaron a cabo basados en bibliografía. Se seleccionaron aquellos protocolos que presentaban un porcentaje superior al 50% de floración *in vitro* en sus resultados, que mantuvieran condiciones controladas en cuanto a temperatura y luz, y el empleo de fitorreguladores directamente relacionados con

la inducción floral *in vitro* de especies vegetales leñosas (Kane et al., 2008; Sharma, Kamal, Srivastava, Dobriyal, & Jadon, 2014; Vu, Anh, & Nhut, 2006b; Zeng et al., 2013b)

## 3.4 Diseño Experimental

Para el trabajo de investigación se utilizó el diseño experimental Plackett Burman (Plackett & Burman, 1946) para evaluar los factores más significativos para la inducción floral *in vitro* de híbridos de mini rosa (*Rosa x Híbrida*). Su selección se basó en trabajos experimentales consecutivos de floración *in vitro* en distintas especies ornamentales. Los factores de estudio fueron siete y se detallan en la Tabla 2. Las variables de respuesta analizadas fueron: “Tiempo de aparición botón floral” y “Número de botones florales” por tratamiento. Para determinar los niveles de los factores se seleccionaron los valores máximos y mínimos (Tabla 2) de acuerdo a los resultados obtenidos en los pre ensayos (Dickens & Van Staden, 1988; Hyndman et al., 1982; Kanchanapoom et al., 2011; Kane et al., 2008; Montero-Carmona et al., 2009; Nak-Udom et al., 2009; Vu et al., 2006; Wang et al., 2002; Yadav & Singh, 2011; Yong, 2004; Zeng et al., 2013).

El diseño experimental estuvo conformado por ocho tratamientos con tres repeticiones cada uno y se detallan en las Tablas 3 y 4. Las variables de respuesta analizadas en el presente estudio fueron “Tiempo de aparición del botón floral” por tratamiento y “Número de botones florales” por tratamiento. La experimentación constó de tres réplicas biológicas.

Tabla 2.

*Factores de estudio para el diseño experimental Plackett Burman con sus valores máximos y mínimos, respectivamente.*

| **Factor** | **Valor máximo** | **Valor mínimo** |
|---|---|---|
| | **(+)** | **(-)** |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **X1** | **6 BAP (mg $L^{-1}$)** | 3,0 | 0,1 |
| **X2** | **ANA (mg $L^{-1}$)** | 0,2 | 0,1 |
| **X3** | **$GA_3$ (mg $L^{-1}$)** | 1 | 0,1 |
| **X4** | **$NH_4NO_3$ (mg $L^{-1}$)** | 8,25 | 0,225 |
| **X5** | **Sacarosa (g $L^{-1}$)** | 50 | 15 |
| **X6** | **Fotoperiodo (h)** | 16/8 | 12/12 |
| **X7** | **Vernalización (h)** | 48 | 24 |

Tabla 3.

*Matriz del diseño experimental Plackett Burman con valores no codificados.*

| **Tratamiento** | **Factores** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **X1** | **X2** | **X3** | **X4** | **X5** | **X6** | **X7** |
| | **6 BAP** | **ANA** | **$GA_3$** | **$NH_4NO_3$** | **Sacarosa** | **Fotoperiodo** | **Vernalización** |
| 1 | + | - | - | + | - | + | + |
| 2 | + | + | - | - | + | - | + |
| 3 | + | + | + | - | - | + | - |
| 4 | - | + | + | + | - | - | + |
| 5 | + | - | + | + | + | - | - |
| 6 | - | + | - | + | + | + | - |
| 7 | - | - | + | - | + | + | + |
| 8 | - | - | - | - | - | - | - |

Adaptado de (Plackett & Burman, 1946)

Tabla 4.

*Matriz del diseño experimental Plackett Burman con valores codificados.*

| Tratamiento | Factores | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | X1 | X2 | X3 | X4 | X5 | X6 | X7 |
| | 6 BAP (mg $L^{-1}$) | ANA (mg $L^{-1}$) | $GA_3$ (mg $L^{-1}$) | $NH_4NO_3$ (g $L^{-1}$) | Sacarosa (g $L^{-1}$) | Fotoperiodo (h) | Vernalización (h) |
| 1 | 3,0 | 0,1 | 0,1 | 8,25 | 15 | 16/8 | 48 |
| 2 | 3,0 | 0,2 | 0,1 | 0,225 | 50 | 12/12 | 48 |
| 3 | 3,0 | 0,2 | 1,0 | 0,225 | 15 | 16/8 | 24 |
| 4 | 1,0 | 0,2 | 1,0 | 8,25 | 15 | 12/12 | 48 |
| 5 | 3,0 | 0,1 | 1,0 | 8,25 | 50 | 12/12 | 24 |
| 6 | 1,0 | 0,2 | 0,1 | 8,25 | 50 | 16/8 | 24 |
| 7 | 1,0 | 0,1 | 1,0 | 0,225 | 50 | 16/8 | 48 |
| 8 | 1,0 | 0,1 | 0,1 | 0,225 | 15 | 12/12 | 24 |

## 3.5 Identificación de factores significativos

El análisis de los datos obtenidos en el diseño experimental Plackett Burman se realizó mediante Diagrama de Pareto en función de los valores obtenidos durante la experimentación. Se utilizó el software estadístico Minitab 18.1.0 (Instituto Nacional Estándares y tecnología (NIST) de los Estados Unidos).

## 3.6 Análisis Estadístico de datos

Para el estudio estadístico se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 0,05 y una prueba de Tukey para determinar si los tratamientos realizados en la experimentación difieren entre sí por pares. El análisis estadístico se desarrolló en el software estadístico Minitab 18.1.0 (Instituto Nacional Estándares y tecnología (NIST) de los Estados Unidos.

## 3.7 Diagrama de procedimientos


*Figura 7*. Diagrama de procesos de la experimentación para la identificación de factores significativos para la floración *in vitro* de híbridos de mini rosa (*Rosa x Híbrida*).

# 4. CAPITULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 4.1 Validación de protocolos de propagación

En la Figura 8 se identifica las fases de establecimiento y multiplicación *in vitro* de los explantes de híbridos de mini rosa (Figura 8). Al cabo de 37 días de incubación los explantes tuvieron alrededor de 10 brotes y pasaron al siguiente estadío que corresponde a la floración *in vitro* demostrándose la validación de los protocolos.

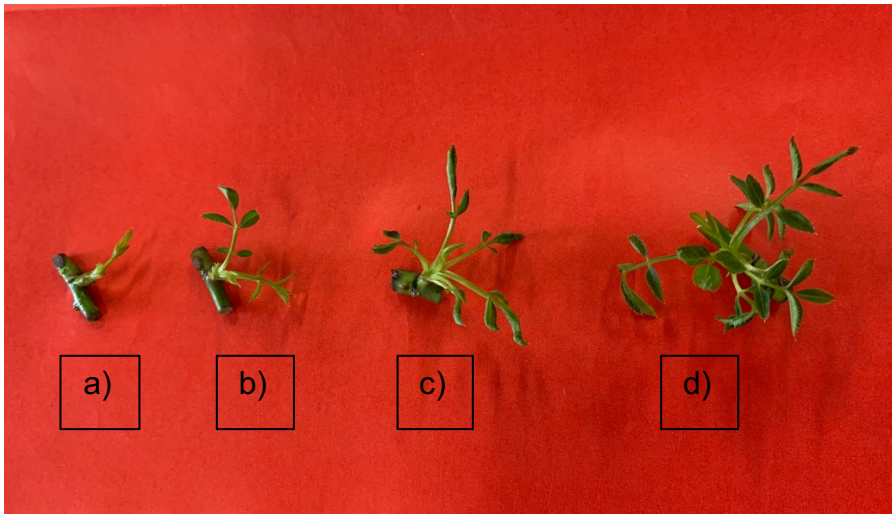



*Figura 8*. Fases de propagación vegetal *in vitro* de híbridos de mini rosa

a) 2 días de cultivo,

b) 7 días,

c) 28 días y

d) 40 días.

## 4.2 Identificación de factores significativos para la floración *in vitro* de híbridos de mini rosa.

### 4.2.1 El fotoperiodo es relevante para el aparecimiento del botón floral

Para la variable “Tiempo de aparición de botón floral”, los resultados del diagrama de Pareto indicaron que el factor F, correspondiente al fotoperíodo, sobrepasa el límite de significancia en relación a los otros factores analizados (Figura 9A), demostrando que este factor es significativo en el presente estudio. De la misma forma, el ANOVA (0,092>0,05) y la prueba de Tukey revelaron que no existen diferencias significativas entre tratamientos (Figura 9B). En resumen, se observó que el tiempo de aparición de botones florales osciló entre 21 a 24 días. El tratamiento 6 se descarta del análisis estadístico, ya que no se obtiene resultados positivos para el presente estudio, es decir, que a lo largo de la experimentación no presentaron crecimiento ni desarrollo vegetativo.

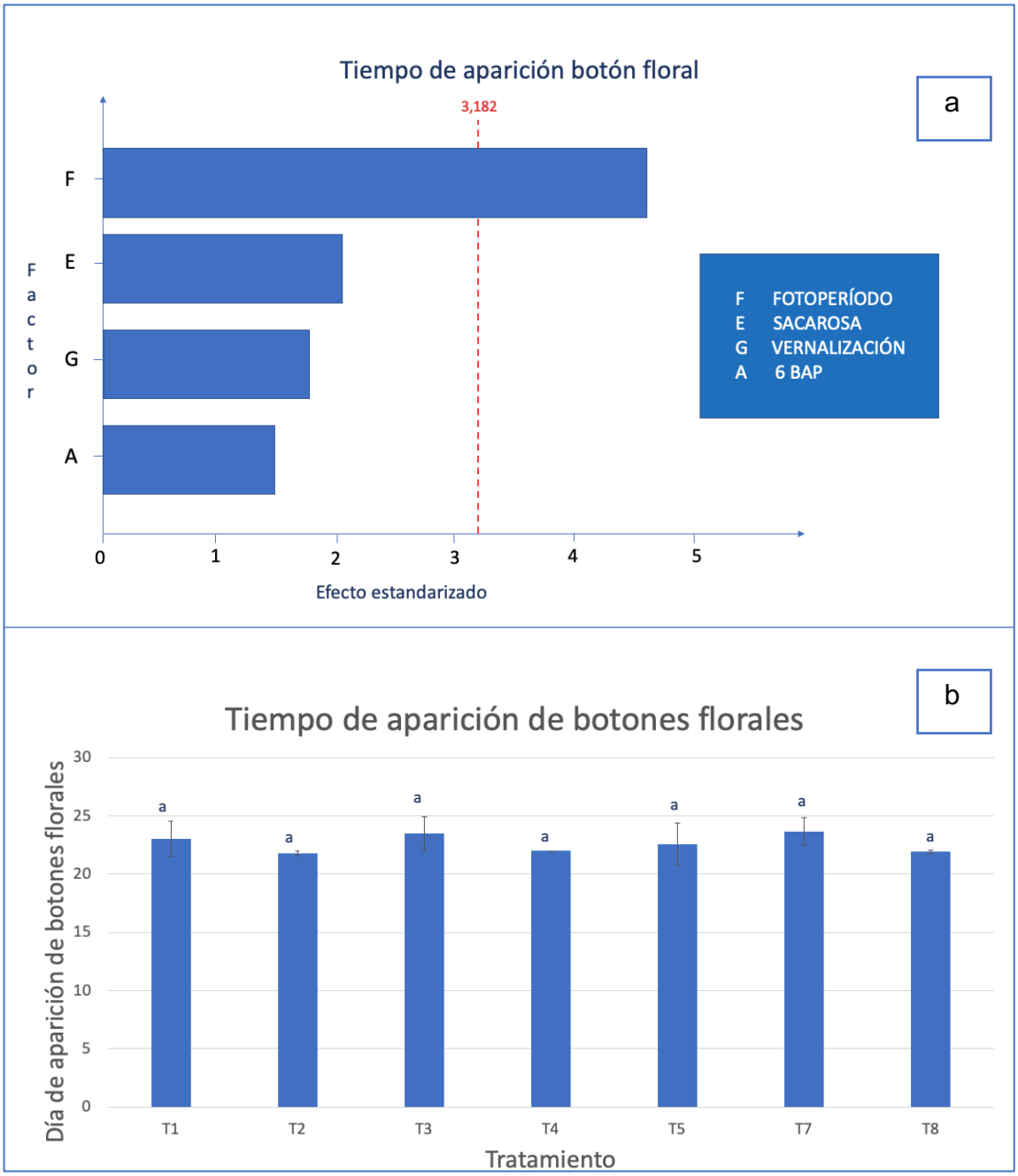



*Figura 9*. Resultados obtenidos en la presente investigación en la variable ¨Tiempo de aparición de botones florales¨.

a) Diagrama de Pareto;

b) Promedio de tiempo y resultados de la prueba de Tukey.

La floración vegetal es considerada un proceso complejo, ya que se encuentra regulada por una combinación de factores ambientales y genéticos. Actualmente, uno de los temas más debatibles del trabajo en campo es la interacción que existe entre los estímulos exógenos y endógenos que promueven la transición floral. Estudios previos han señalado la importancia del fotoperiodo como un estímulo exógeno que influye en el cambio de meristemo apical a floral, puesto que promueve la producción de giberelinas en la planta (Mohamed et al., 2018). Se han observado que procedimientos llevados a cabo, bajo condiciones controladas como la floración *in vitro*, facilitan el estudio de la influencia de los estímulos exógenos durante la transición floral, la fisiología y morfología de la floración vegetal (Murthy & Rao, 2012b). Trabajos realizados en floración *in vitro* de especies vegetales como *Dendrocalamus hamiltonii* determinaron que el fotoperiodo es un factor crucial en el tiempo de aparición de botones florales. Los hallazgos de la investigación indicaron que, manteniendo un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, la primera estructura floral apareció al cabo de 91 días de cultivo (Kaur *et al*., 2014). En el género *Phalaenopsis* no se observa floración *in vitro* bajo un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (Duan & Yazawa, 1995). Estudios en el género *Rosa* establecieron que el fotoperiodo tiene poca influencia en el tiempo de aparición de botones florales durante la floración *in vitro* (Zeng et al., 2013a). En contraste, los resultados de la presente investigación demuestran que, en un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, las primeras estructuras florales aparecieron a los 21 días, tiempo muy reducido con relación a los trabajos previamente citados. Esto podría deberse a que las plantas madre utilizadas en el presente estudio se mantuvieron en la zona ecuatorial, en donde las condiciones de temperatura y luz son constantes a lo largo del año, 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Por otra parte, es importante aclarar que, un exceso de luz podría tener un efecto negativo sobre la floración. Es así que, Heylen y Vendrig en (1988) establecen que el exceso de luz durante la fase luminosa del fotoperiodo, genera un aumento en la respiración celular, ocasionando una menor absorción de dióxido de carbono ($CO_2$) por parte de la planta y asimismo foto inhibiendo la fotosíntesis; se recomienda controlar la intensidad y también

los períodos de luz y oscuridad (Bouman, Platt, Sathyendranath, & Stuart, 2005; Farquhar, Von Caemmerer, & Berry, 2001; Zimmerman, 2006).

Desde otro punto de vista, se plantea la opción que la sacarosa podría generar un efecto conjunto con el fotoperiodo, para acelerar el proceso de floración *in vitro*. Esta idea está sustentada en el estudio realizado por Montero y Carmona *et* al. (2009), donde se demuestra que la transición de meristemo vegetativo a reproductivo, demanda una alta cantidad de energía, que la fotosíntesis por sí misma no puede suplementar *in vitro*. Por eso se hace necesaria la adición de una fuente externa de carbono para facilitar esta transición y así poder evaluar la influencia; razón por la cual, en el presente estudio se deduce que existe un agotamiento en el porcentaje de carbohidratos, inhibiendo el crecimiento y la floración *in vitro* de híbridos de mini rosa. Sin embargo, es necesario más estudios para comprobarla.

### 4.2.2 Tres factores influyeron en el número de botones florales

Los resultados obtenidos de la evaluación e identificación de variables significativas, para la floración *in vitro* de híbridos de mini rosa inició con la identificación de estructuras pre florales (Figura 10A); en las cuales se observó el crecimiento del gineceo y androceo a través del estereoscopio (Figura 10B). Al cabo de 10 días se comenzó a identificar la formación de botones florales (Figura 10C), la mayoría de tratamientos de la presente investigación se tornaron de color marrón, como una especie de marchitamiento que se puede observar a través del estereoscopio (Figura 10D). Finalmente se presenció la etapa de apertura floral en la experimentación en la cuál se destacan los colores de los pétalos (Figura 10E), mediante la utilización del estereoscopio se identificaron principalmente las anteras, estilo y estigma (Figura 10F).


*Figura 10*. Resultados obtenidos en la presente investigación

a) Estructuras pre florales en el cultivo *in vitro,*

b) Vista al estereoscopio de estructuras pre florales,

c) Botón floral del explante en cultivo *in vitro*,

d) Vista al estereoscopio del botón floral,

e) Apertura del botón floral en el cultivo *in vitro*,

f) Vista al estereoscopio de la apertura del botón floral.

Para la variable “Número de botones florales”, los resultados del análisis estadístico fueron; la prueba de Tukey diferencias significativas entre tratamientos y en el ANOVA (0,002>0,05) (Figura 11B). En el diagrama de Pareto se puede identificar que el factor D, F y B correspondientes al nitrato de amonio ($NH_4NO_3$), fotoperiodo y ANA, respectivamente sobrepasan el límite de significancia en relación a los otros factores analizados (Figura 11A). Finalmente se determina un porcentaje de floración *in vitro* de 78,49% en el tratamiento 8. De igual manera que en la variable anterior, el tratamiento 6 se descarta del análisis estadístico, ya que no se obtiene resultados positivos para el presente estudio es decir, no se observa desarrollo vegetativo a lo largo de la experimentación.

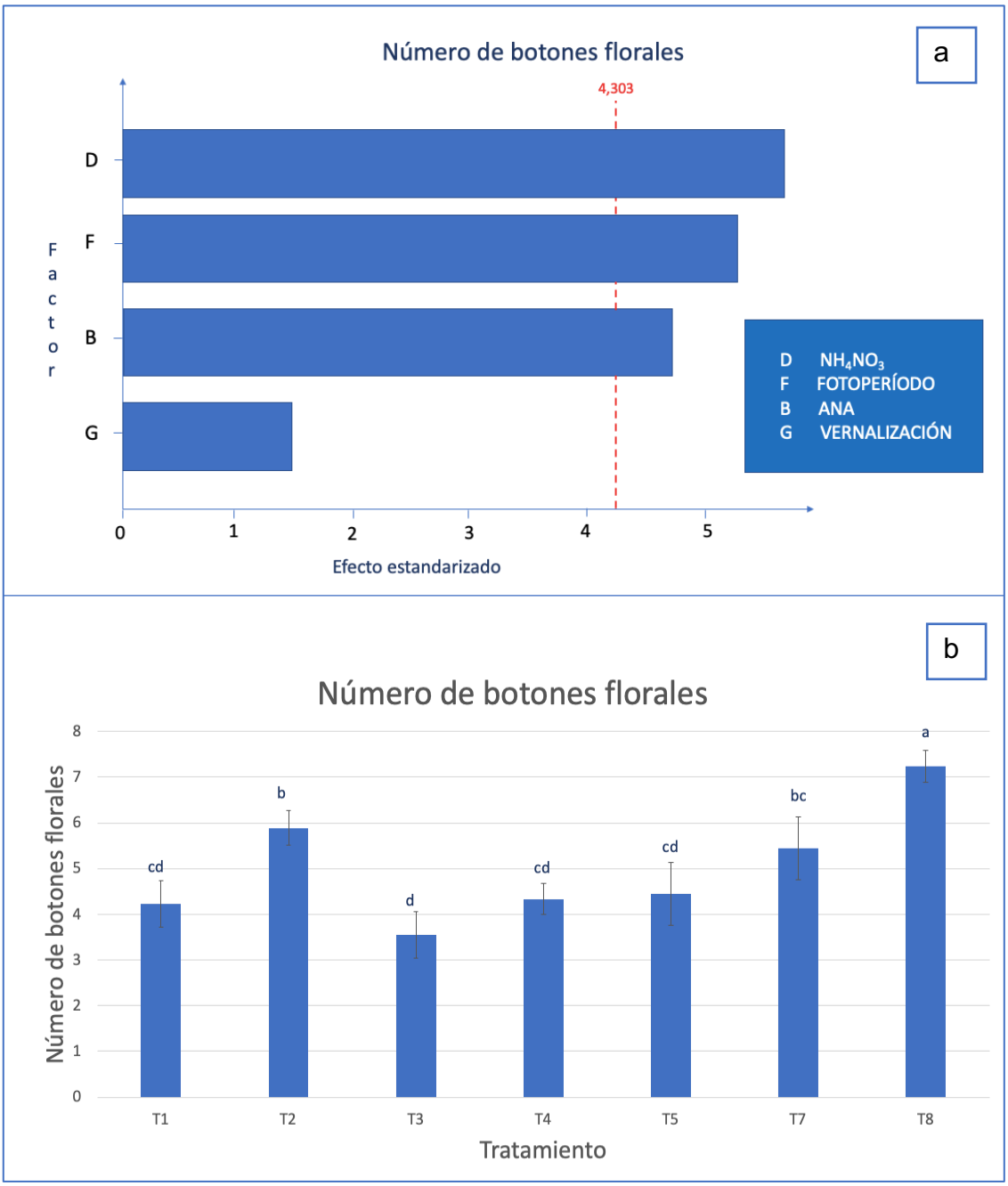



*Figura 11*. Resultados obtenidos en la presente investigación en la variable ¨Número de botones florales¨

a) Diagrama de Pareto,

b) Promedio de tiempo y resultados de la prueba de Tukey.

La literatura existente reporta una estrecha relación entre la fuente de nitrógeno y de carbono en el medio de cultivo con respecto a la floración *in vitro* (Kachonpadungkitti, Romchatngoen, Hasegawa, & Hisajima, 2001). La presencia de nitrógeno en el medio de cultivo puede fomentar el desarrollo vegetativo y a su vez reducir la inducción floral *in vitro*. Asimismo, una alta concentración de sacarosa y baja de nitrógeno estimula el cambio morfológico de meristemo apical a meristemo reproductivo (Kolář & Seňková, 2008). Diversos estudios han establecido que una concentración de 0,360 mg $L^{-1}$ $NH_4NO_3$ en el medio de cultivo induce la formación de botones florales *in vitro* en especies vegetales como *Pisum sativum, Rauvolfia tetraphylla, Rosa miniatura* y en la familia Orchidaceae (Franklin, Pius, & Ignacimuthu, 2000; Pati et al., 2006; Sadern & Dreunckol, 2006; Teixeira Da Silva et al., 2014). En contraste, en el género *Phalaenopsis* las investigaciones determinaron que una alta concentración de nitrógeno en el medio de cultivo inhibe la floración *in vitro* (Duan & Yazawa, 1995). En un estudio realizado en *Arabidopsis thaliana* se analizaron los factores que estimulan de manera positiva o negativa el proceso de floración *in vitro*. Los resultados establecieron que la disminución en la concentración de la fuente de nitrógeno ($NH_4NO_3$) en el medio de cultivo durante la fase reproductiva, promovió la floración en un eco tipo determinado, presentando una incidencia de floración del 68,9% (Mathúna, 2007). Los resultados obtenidos en la presente investigación concuerdan con lo mencionado en Mathúna (2007) , puesto que la concentración de $NH_4NO_3$ empleada en el medio de cultivo fue la más baja (0,225 g $L^{-1}$); la deficiencia de nitrógeno en la planta estimula la síntesis de proteínas de crecimiento, y la etapa de floración ocurre en la senescencia de la planta. Por lo tanto, la respuesta fisiológica será inducir al estadío reproductivo y así fomentar la formación de estructuras florales; como se ha determinado en Dickens y Van Staden (1988), los cuales determinaron la relación positiva que existe entre la deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo y el proceso de floración *in vitro*, por lo tanto, se puede corroborar en los resultados obtenidos en la presente investigación.

Además de la deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo, la acción de ciertas auxinas y citoquininas pueden inducir la floración *in vitro* (Geekiyanage, Takase,

Watanabe, Fukai, & Kiyosue, 2006). La función de las auxinas endógenas es la de fomentar el crecimiento celular en respuesta a la luz que perciben; por su parte, las auxinas sintéticas en el cultivo *in vitro* pueden promover la transición floral. ANA es una auxina sintética ampliamente utilizada en la floración *in vitro* debido a que es necesaria para la formación de botones florales (Taylor & Vasil, 1993). Estudios señalan que en especies vegetales como: *Streptocarpus nobilis, Paniculata jack, Gypsophila paniculata, Buldophylum auricomum* la presencia de ANA en conjunto con algunas citoquininas obtienen un porcentaje superior al 50% de floración *in vitro*, obteniendo una morfología normal en la formación de botones florales con relación a los que se obtienen *in vivo* (Behera et al., 2018; Jumin & Ahmad, 1999; Kaur et al., 2014; Sharma et al., 2014) En contraste, la mayoría de estudios realizados en especies leñosas determinan que ANA es una fitohormona que puede afectar la floración *in vitro* cuando no existe la presencia de una citoquinina en el medio de cultivo (Nak-Udom et al., 2009). Según Kamnoon, Kanchanapoom y Sakpeth (2010) una concentración de 0,25 mg $L^{-1}$ de ANA en el medio de cultivo activa la síntesis de auxinas endógenas en la planta y de esta manera estas fitohormonas actúan como mensajeros químicos, fomentando la interacción entre células, como se demuestra en la presente investigación ya que se puede evidenciar que ANA es capaz de estimular la transición vegetal hacia el estadío reproductivo en los explantes de híbridos de mini rosa.

El estudio realizado por (Altamura & Tomassi, 1998) propone que factores como; luz del fotoperiodo, auxinas exógenas y putrescina promueven la formación de botones florales en *N. tabacum*. Los resultados determinaron que la luz puede ejercer un papel morfogénico y trófico, pero no fotosintético durante la floración *in vitro* de *N. tabacum*; a su vez, la presencia de auxinas exógenas en el medio de cultivo estimula la biosíntesis de putrescina y su acumulación favorece a la floración *in vitro*. Lo referido anteriormente guarda relación con lo obtenido en el presente trabajo experimental, dado que el análisis estadístico determinó que la combinación de ANA (0,1 mg $L^{-1}$), fotoperiodo (12/12 h) y $NH_4NO_3$ (0,225 g $L^{-1}$) indujo la formación de botones florales en un 78,49%. La proporción de auxinas

y citoquininas en ciertos tejidos de la planta determina el inicio de la parte reproductiva de la misma, es decir, que es necesario utilizar a las dos en el medio de cultivo, para así inducir la etapa de floración. Por consiguiente, se puede inferir que existe una relación positiva en la acción de ANA, $NH_4NO_3$ y las condiciones específicas de fotoperiodo para fomentar la transición floral *in vitro* de híbridos de mini rosa.

# 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 5.1 Conclusiones

En cuanto a los factores analizados en este estudio, se determinó que el fotoperiodo es el factor significativo para la variable de respuesta “Tiempo de aparición botón floral” de híbridos de mini rosa. Los resultados de la presente investigación demuestran que, en un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, las primeras estructuras florales aparecieron a los 21 días. Esto podría deberse a que las condiciones de temperatura y luz son constantes a lo largo del año en la zona ecuatorial, de donde proceden las plantas madre.

Por otro lado, en cuanto a la variable “Número de botones florales”, se determinó que $NH_4NO_3$, el fotoperiodo y ANA son factores significativos en el presente estudio. Los resultados obtenidos determinan que la concentración de $NH_4NO_3$ empleada en el medio de cultivo fue la más baja (0,225 g $L^{-1}$), fomentando la inducción floral *in vitro* de híbridos de mini rosa, ya que la deficiencia de nitrógeno en la planta estimula la síntesis de proteínas de crecimiento; ANA en el medio de cultivo activa la síntesis de auxinas endógenas en la planta y de esta manera estas fitohormonas actúan como mensajeros químicos, siendo capaces de estimular la transición vegetal hacia el estadio reproductivo; finalmente, la interacción del fotoperiodo, las auxinas sintéticas y la putrescina promueven la formación de botones florales, debido a que la luz puede ejercer un papel morfogénico y trófico pero no fotosintético durante la floración *in vitro*.

Para finalizar, las condiciones óptimas para la floración *in vitro* de híbridos de mini rosa consistieron en: pretratamiento de por lo menos 24 h de vernalización a una temperatura de 5ºC; un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad; una concentración de 0,225 mg $L^{-1}$ de $NH_4NO_3$ y una concentración de 0,1 mg $L^{-1}$ de ANA en el medio de cultivo MS modificado. Con estas condiciones, se obtuvo un 78,49% de floración *in vitro* de híbridos de mini rosa, aunque no en todos hubo apertura floral.

## 5.2 Recomendaciones

En primera instancia, se recomienda realizar un cultivo de meristemos para evitar la contaminación bacteriana y fúngica del material vegetal. De esta manera, se puede descartar cualquier respuesta fisiológica a contaminantes que pueden alterar los resultados.

Se propone adicionar factores de estudio como el pH y subcultivos periódicos, ya que pueden tener una relación directa con la floración *in vitro* de híbridos de mini rosa. Además, se recomienda realizar el período de vernalización en completa oscuridad, para generar más estrés a la planta y así fomentar la floración *in vitro*.

Finalmente, se sugiere seguir con el estudio de la floración *in vitro* de híbridos de mini rosa, para ser utilizada como modelo vegetal en la investigación de la mejora genética a partir de cultivo de anteras.

## REFERENCIAS

Altamura, M. M., & Tomassi, M. (1998). *Auxin, photoperiod and putrescine affect flower neoformation in normal and rolb-transformed tobacco thin cell layers. Plant Physiology and Biochemistry, 36*(6), 441–448. https://doi.org/10.1016/S0981-9428(98)80208-8

Amiens Flora. (2019). Rosa canina Eglanter des chiens. Recuperado el 28 de noviembre del 2019 de http://aesgsf.free.fr/V5/arbres-de-picardie-rosa-canina-glantier-des-chiens-es.html

Arctos. (2017). *Taxonomy Collection*. Recuperado de https://arctos.database.museum/name/Rosaceae

Arévalo, M., Guzman, H., Peña, C., Castillo, A., Colinas, M., & Mandujano, M. (2011). *INFLUENCE OF HARVEST INDEX VASE LIFE OF FIVE Rosa Hybrida SPECIES*, 3–11.

Asociación Española de plantas carnívoras. (2019). Drosophyllum. Recuperado el 06 de enero del 2020 de http://daepc.org/

Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2008). Fundamentos de Fisiología Vegetal. En Fundamentos de Fisiología Vegetal (Segunda, pp. 499–515).

Azón López, E., Hernández Pérez, J., & Mir Ramos, E. (2013). Evidencia científica sobre el uso del aceite de rosa mosqueta en el embarazo: una revisión de la bibliografía. Medicina Naturista, *7*, 94–98.

Baghel, S., & Bansal, Y. K. (2014). *Synergistic effect of BAP and GA3 on in vitro flowering of Guizotia abyssinica Cass.-A multipurpose oil crop. Physiology and Molecular Biology of Plants*, *20*(2), 241–247. https://doi.org/10.1007/s12298-014-0229-3

Behera, S. K., Rajasekaran, C., Payas, S., Fulzele, D. P., Doss, C. G. P., & Siva, R. (2018). *In vitro flowering in Oldenlandia umbellata L. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, *9*(2), 99–103.

https://doi.org/10.1016/j.jaim.2017.02.011

Bidwell, R. g. . (1979). Fisiología Vegetal. In S. . AGT EDITOR (Ed.), Fisiología Vegetal (1era en es, pp. 439–458). Ontario.

Bouman, H., Platt, T., Sathyendranath, S., & Stuart, V. (2005). *Dependence of light-saturated photosynthesis on temperature and community structure. Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, *52*(7), 1284–1299. https://doi.org/10.1016/j.dsr.2005.01.008

Burnie, G. (2013). Botánica. In H. F. Ullmann (Ed.), Botánica Guía ilustrada de plantas (pp. 504–516).

Campos-Rivero, G., Osorio-Montalvo, P., Sánchez-Borges, R., Us-Camas, R., Duarte-Aké, F., & De-la-Peña, C. (2017). *Plant hormone signaling in flowering: An epigenetic point of view*. *Journal of Plant Physiology*, *214*, 16–27. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.03.018

Cancino-Escalante, G. O., Quevedo García, E., Villamizar, C. E., & Díaz Carvajal, C. (2015). Propagación *in vitro* de materiales seleccionados de Rubus glaucus Benth (mora de Castilla) en la provincia de Pamplona, región nororiental de Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología, *17*(2), 7–15. https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54262

Castilla, Y. (2005). Revisión bibliográfica CULTIVO DE TEJIDOS DE ROSAS ( *Rosa* spp .): UN ACERCAMIENTO. *Redalyc.Org*, *26*(4), 43–47. Recuperado el 14 de sepriembre del 2019 de http://www.redalyc.org/pdf/1932/193216160006.pdf

Cherri-martin, M. (2007). *Fragrance heritability in Hybrid Tea roses*, *113*, 177–181. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.03.002

Dickens, C. W. S., & van Staden, J. (1988). *The induction and evocation of flowering in vitro. South African Journal of Botany*, *54*(4), 325–344. https://doi.org/10.1016/S0254-6299(16)31299-6

Duan, J. X., & Yazawa, S. (1995). *Floral induction and development in Phalaenopsis in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *43*(1), 71–74.

https://doi.org/10.1007/BF00042674

Ercisli, S. (2005). *Rose ( Rosa spp .) Germplasm resources of Turkey*, 787–795. https://doi.org/10.1007/s10722-003-3467-8

Farquhar, G. D., Von Caemmerer, S., & Berry, J. A. (2001). Models of photosynthesis. *Plant Physiology*, *125*(1), 42–45. https://doi.org/10.1104/pp.125.1.42

Franklin, G., Pius, P. K., & Ignacimuthu, S. (2000). *Factors affecting in vitro flowering and fruiting of green pea* (*Pisum sativum L.*). *Euphytica*, *115*(1), 65–73. https://doi.org/10.1023/A:1003982900117

Gardencenterejea. (2019). *Gardencenterejea Rosa Gertrude*. Recuperado el 21 de septiembre del 2019 de https://gardencenterejea.com/rosales/1146-rosa-gertrude-jekyll-t.html

Geekiyanage, S., Takase, T., Watanabe, S., Fukai, S., & Kiyosue, T. (2006). *The combined effect of photoperiod, light intensity and GA3 on adventitious shoot regeneration from cotyledons of spinach* (Spinacia oleracea L.). *Plant Biotechnology*, *23*(4), 431–435. https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.23.431

Goody, J. (1993). The culture of Flowers. En *The culture of Flowers* (pp. 120–125).

Guo, X., Yu, C., Luo, L., Wan, H., Zhen, N., Xu, T., Zhang, Q. (2017). *Transcriptome of the floral transition in Rosa chinensis "Old Blush." BMC Genomics*, *18*(1), 1–18. https://doi.org/10.1186/s12864-017-3584-y

Heylen, C., & Vendrig, J. C. (1988). *The Influence of Different Cytokinins and Auxins on Flower Neoformation in Thin Cell Layers of Nicotiana tabacum L. Plant and Cell Physiology, 29*(Febrero), 665–671. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077544

Hyndman, S., Bressan, P. H., Kim, Y., Hyndman, S. E., Hasegawa, P. M., & Bressan, R. A. (1982). *Factors affecting in vitro propagation of rose Factors Affecting in Vitro Propagation of Rose 1,* (Enero).

Ignacio, J., & Diaz, R. (2017). Técnicas tradicionales y biotecnológicas en el mejoramiento genético del rosal *( Rosa* spp *.)*.

Jumin, H. B., & Ahmad, M. (1999). *High-frequency in vitro flowering of Murraya paniculata (L.)* Jack. *Plant Cell Reports*, *18*(9), 764–768. https://doi.org/10.1007/s002990050657

Kachonpadungkitti, Y., Romchatngoen, S., Hasegawa, K., & Hisajima, S. (2001). *Efficient flower induction from cultured buckwheat (Fagopyrum esculentum L.) node segments in vitro. Plant Growth Regulation*, *35*(1), 37–45. https://doi.org/10.1023/A:1013818328619

Kamboj, A., & Saluja, A. (2010). *Phytopharmacological review of Xanthium strumarium L.* (Cocklebur). *International Journal of Green Pharmacy*, *4*(3), 129. https://doi.org/10.4103/0973-8258.69154

Kanchanapoom, Kamnoon, Kanchanapoom, K., & Sakpeth, P. (2010). *In vitro flowering of shoots regenerated from cultured nodal expiants of Rosa hybrida cv. "Heirloom." ScienceAsia*, *36*(2), 161–164. https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2010.36.161

Kantamaht, Kanchanapoom, Jingjit, S., & Kanchanapoom, K. (2011). *In vitro flowering of shoots regenerated from cultured nodal explants of Gypsophila paniculata L. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *39*(1), 84–87. https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2010.36.161

Kane, M., Johnson, T., & Kauth, P. (2008). *In Vitro Flowering of Rose*, *14*, 201–205.

Kardavan, V. (2015). *Plant Molecular Biology*. *Plant Molecular Biology & Biotechnology OriginalArticle*, *5*(1), 7–12.

Kaur, D., Thapa, P., Sharma, M., Bhattacharya, A., & Sood, A. (2014). *In vitro flowering - A system for tracking floral organ development in Dendrocalamus hamiltonii Nees et Arn. ex Munro. Indian Journal of Experimental Biology*, *52*(8), 825–834.

King, R. W., Moritz, T., Evans, L. T., Junttila, O., & Herlt, A. J. (2001). *Long-day*

*induction of flowering in Lolium temulentum involves sequential increases in specific gibberellins at the shoot apex. Plant Physiol*, *127*(2), 624–632. https://doi.org/10.1104/pp.010378

Kolář, J., & Seňková, J. (2008). *Reduction of mineral nutrient availability accelerates flowering of Arabidopsis thaliana. Journal of Plant Physiology*, *165*(15), 1601–1609. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.11.010

Koncsak, J. (2008). Evaluación de Bayvarol, Bienenwohl, Apilife Var y ácido oxálico en el control del ácaro Varroa destructor Anderson & Trueman *(Mesostigmata: Varroidae)* en época primaveral en Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile.

Kurokura, T., Mimida, N., Battey, N. H., & Hytönen, T. (2013). *The regulation of seasonal flowering in the Rosaceae. Journal of Experimental Botany*, *64*(14), 4131–4141. https://doi.org/10.1093/jxb/ert233

Laurie, D. (2004). HandBook of plant Biotechnology (Vol 2). En P. Christou & H. Klee (Eds.), *HandBook of plant Biotechnology (Vol 2)* (pp. 659–671).

Mikanagi, Y., Saito, N., & Yokoi, M. (2000). *Anthocyanins in # owers of genus Rosa , sections Cinnamomeae ( " Rosa ), Chinenses , Gallicanae and some modern garden roses*, *28*.

Mohamed, N., Taha, R. M., Razak, U. N. A. A., & Elias, H. (2018). *Papel dos reguladores de crescimento de plantas no desenvolvimento dos estudos in vitro de floração, histologia e ultrastruturais de Impatiens balsamina cv. Dwarf bush. Planta Daninha*, *36*, 1–9. https://doi.org/10.1590/s0100-83582018360100013

Montero-Carmona, W., Jiménez, V. M., Rica, T. D. C., Regional, S., Carlos, S., Rica, C., … Pedro, S. (2009). Floración *in vitro* – revisión de literatura, *9*(1), 3–18.

Murthy, K. S. R., & Rao, C. (2012a). *In vitro flowering - A review*, *8*(5), 1517–1536.

Murthy, K. S. R., & Rao, C. (2012b). *In vitro flowering - A review. International*

*Journal of Agricultural Technology*, *8*(5), 1517–1536.

Nak-Udom, N., Kanchanapoom, K., & Kanchanapoom, K. (2009). *Micropropagation from cultured nodal explants of rose (Rosa hybrida l. cv. 'Perfume Delight'). Songklanakarin Journal of Science and Technology*, *31*(6), 583–586.

O'Mathúna, D. P. (2007). *Bioethics and biotechnology. Cytotechnology*, *53*(1–3), 113–119. https://doi.org/10.1007/s10616-007-9053-8

Olszyk, D., Pfleeger, T., Shiroyama, T., Blakeley-Smith, M., Lee, E. H., & Plocher, M. (2017). *Plant reproduction is altered by simulated herbicide drift to constructed plant communities. Environmental Toxicology and Chemistry*, *36*(10), 2799–2813. https://doi.org/10.1002/etc.3839

Pati, P. K., Rath, S. P., Sharma, M., Sood, A., & Ahuja, P. S. (2006). *In vitro propagation of rose - A review. Biotechnology Advances*, *24*(1), 94–114. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.07.001

Philips, R., & Rix, M. (2004). *Guide of Roses.* En *The Ultimate Guide to Roses* (pp. 134–139).

Phillips, R., & Rix, M. (2009). *The Ultimate Guide to Roses*. *Macmillan*, *3*, 226.

Plackett, R., & Burman, P. (1946). *The Design of Optimum Multifactorial Experiments. Oxford University Press on Behalf of Biometrika Trust*, *Vol.33*, 305–325. https://doi.org/10.2307/2332195

Raina, S. N., Ahuja, P. S., Sharma, R. K., Das, S. C., Bhardwaj, P., Negi, R., … Mandi, S. S. (2012). *Genetic structure and diversity of India hybrid tea*, 1527–1541. https://doi.org/10.1007/s10722-011-9782-6

Roque, E., Fares, M. A., Yenush, L., Rochina, M. C., Wen, J., Mysore, K. S., … Cañas, L. A. (2016). *Evolution by gene duplication of Medicago truncatula PISTILLATA-like transcription factors. Journal of Experimental Botany*, *67*(6), 1805–1817. https://doi.org/10.1093/jxb/erv571

Sadern, A., & Dreunckol, K. (2006). *In vitro flowering in Ruvolfia tetraphylla.*

*Pakistan Journal of Biological Science*, *3*, 422–424.

Sharma, V., Kamal, B., Srivastava, N., Dobriyal, A. K., & Jadon, V. S. (2014). *In Vitro Flower Induction from Shoots Regenerated from Cultured Axillary Buds of Endangered Medicinal Herb Swertia chirayita H. Karst . Biotechnology Research International*, *2014*, 1–5. https://doi.org/10.1155/2014/264690

Taiz, L., & Zeiger, E. (2008). Sin Título. In *Fisiología Vegetal* (pp. 1119–1120).

Taylor, M. G., & Vasil, V. (1993). *PlantCeU Reports. Plant Cell Reports*, 491–495.

Teixeira Da Silva, J. A., Kerbauy, G. B., Zeng, S., Chen, Z., & Duan, J. (2014). *In vitro flowering of orchids. Critical Reviews in Biotechnology*, *34*(1), 56–76. https://doi.org/10.3109/07388551.2013.807219

Uggla, M., Gao, X., & Werlemark, G. (2003). *Variation among and within dogrose taxa (Rosa sect. caninae) in fruit weight, percentages of fruit flesh and dry matter, and vitamin C content. Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science*, *53*(3), 147–155. https://doi.org/10.1080/09064710310011746

Verdugo, N., & Andrade, V. (2018). Productos tradicionales y no tradicionales del Ecuador: Posicionamiento y eficiencia en el mercado internacional para el período 2013-2017 Traditional and non-traditional products of Ecuador: Positioning and efficiency in the international market for the , *2*(3), 84–102.

Vu, N. H., Anh, P. H., & Nhut, D. T. (2006a). *The role of sucrose and different cytokinins in the in vitro floral morphogenesis of rose (hybrid tea) cv.* “First Prize.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *87*(3), 315–320. https://doi.org/10.1007/s11240-006-9089-z

Wang, G. Y., Yuan, M. F., & Hong, Y. (2002). *In vitro flower induction in roses. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *38*(5), 513–518. https://doi.org/10.1079/IVP2002340

Wirecard Bank, A. (2019). Rosas modernas de Jardín. Recuperado el 13 de diciembre del 2019 de https: //verdecora.es/rosales/252076-rosal-grandiflora-variedades-copa-lvl4-.html

Xiaohua, J., Dezhu, L., Zongxin, R., Xiaoguo, X., Laongpol, C., Suzuki, K., … Yazawa, S. (2009). ( *Doritis pulcherrima X Kingiella philippinensis* ). *BMC Plant Biology*, *12*(October 2006), 106–133. https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-67

Yadav, K., & Singh, N. (2011). *IN VITRO FLOWERING OF SHOOTS REGENERATED FROM CULTURED NODAL EXPLANTS OF Spilanthes acmella MURR. -AN ORNAMENTAL CUM MEDICINAL HERB. Analele Universităţii Din Oradea -Fascicula Biologie Tom. XVIII*, (1), 66–70. https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2010.36.161

Yong, A. (2004b). Revisión bibliográfica EL CULTIVO DEL ROSAL Y SU PROPAGACIÓN.

Zeng, S., Liang, S., Zhang, Y. Y., Wu, K. L., Teixeira da Silva, J. A., & Duan, J. (2013a). *In vitro flowering red miniature rose. Biologia Plantarum*, *57*(3), 401–409. https://doi.org/10.1007/s10535-013-0306-4

Zeng, S., Liang, S., Zhang, Y. Y., Wu, K. L., Teixeira da Silva, J. A., & Duan, J. (2013b). *In vitro flowering red miniature rose. Biologia Plantarum*, *57*(3), 401–409. https://doi.org/10.1007/s10535-013-0306-4

Zimmerman, R. C. (2006). *Light and photosynthesis in seagrass meadows*. *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*, 303–321. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2983-7_1