

TÉCNICAS TRADICIONALES Y BIOTECNOLÓGICAS

en el mejoramiento genético
del rosal (*Rosa* spp.)

Amaury Martín Arzate-Fernández

Mónica Deneb Bautista-Puga

José Luis Piña-Escutia

Jesús Ignacio Reyes-Díaz

Luis Miguel Vázquez-García



UAEM

Universidad Autónoma
del Estado de México

Técnicas tradicionales y biotecnológicas
en el mejoramiento genético del rosal
(*Rosa* spp.)

Este libro fue dicatminado positivamente bajo el sistema de revisión de pares doble ciego,
conforme lo establecen los lineamientos del Consejo General Editorial
de la Universidad Autónoma del Estado de México.

SB

411.54

.T43

2014

(L.C.) Library of Congress

Técnicas tradicionales y biotecnológicas en el mejoramiento genético del
rosal, *Rosa* spp / Amaury Martín Arzate-Fernández ... [et al.].— 1ª ed.—
Toluca, Estado de México : UAEM, Facultad de Ciencias, 2014.

114 p. : il. col. ; 23 cm.— (Ciencia Agropecuaria. Agronomía).

Incluye referencias bibliográficas.

ISBN: 978-607-422-547-1

1. Mejoramiento selectivo de la rosa 2. Rosas. 3. Genética vegetal.

Técnicas tradicionales y biotecnológicas en el mejoramiento genético del rosal (*Rosa* spp.)



Amaury Martín Arzate-Fernández
Mónica Deneb Bautista-Puga
José Luis Piña-Escutia
Jesús Ignacio Reyes-Díaz
Luis Miguel Vázquez-García



UAEM

Universidad Autónoma
del Estado de México

“2014, 70 Aniversario de la Autonomía ICLA-UAEM”

Primera edición, julio 2014

Técnicas tradicionales y biotecnológicas en el mejoramiento genético del rosal (Rosa spp.)

Amaury Martín Arzate-Fernández | Mónica Deneb Bautista-Puga | José Luis Piña-Escutia | Jesús Ignacio Reyes-Díaz | Luis Miguel Vázquez-García

Universidad Autónoma del Estado de México

Av. Instituto Literario 100 Ote.

Toluca, Estado de México

C.P. 50000

Tel. (52) 722 277 38 35 y 36

<http://www.uaemex.mx>

direccioneditorial@uaemex.mx



Esta obra está sujeta a una licencia *Creative Commons* Atribución 2.5 México (CC BY 2.5). Para ver una copia de esta licencia visite <http://creativecommons.org/licenses/by/2.5/mx>. Puede ser utilizada con fines educativos, informativos o culturales, siempre que se cite la fuente. Disponible para su descarga en acceso abierto en: <http://ri.uaemex.mx/>

Citación:

Amaury Martín Arzate-Fernández, Mónica Deneb Bautista-Puga, José Luis Piña-Escutia, Jesús Ignacio Reyes-Díaz, Luis Miguel Vázquez-García (2014), *Técnicas tradicionales y biotecnológicas en el mejoramiento genético del rosal (Rosa spp.)*, (ISBN: 978-607-422-547-1), México, Universidad Autónoma del Estado de México.

Responsable editorial: Rosario Rogel Salazar. Coordinación editorial: María Lucina Ayala López. Corrección de estilo: Daniela Arellano Bautista. Formación y diseño: Elizabeth Vargas Albarrán. Diseño de forros: Concepción Contreras Martínez. Imágenes de portada: Amaury Martín Arzate-Fernández.

ISBN: 978-607-422-547-1

Impreso y hecho en México

Printed and made in Mexico

CONTENIDO

PRÓLOGO	9
---------	---

CAPÍTULO 1 GENERALIDADES DE LA ROSA

Importancia de la rosa	13
Taxonomía	15
Descripción botánica	16
Distribución	18
Clasificación	18
<i>Rosas silvestres</i>	19
<i>Rosas antiguas</i>	19
<i>Rosas modernas</i>	24

CAPÍTULO 2 MEJORAMIENTO GENÉTICO CONVENCIONAL DE LA ROSA

Reproducción sexual	34
<i>Polen y polinización</i>	34
<i>Maduración de semillas y germinación</i>	36
Genética de la rosa	38
<i>Meiosis</i>	41

Hibridación	44
<i>Hibridación intergenérica</i>	44
<i>Hibridación interespecífica</i>	46
Propagación asexual: ventajas y desventajas	47
Apomixis	49
<i>Mejoramiento genético de especies apomícticas</i>	52
Criterios para la selección de materiales en la mejora genética	53
<i>Resistencia a enfermedades</i>	53
<i>Floración recurrente</i>	58
<i>Morfología de la flor</i>	59
<i>Espinas</i>	59

CAPÍTULO 3

MEJORAMIENTO GENÉTICO POR CULTIVO DE TEJIDOS

Micropropagación de rosa	64
Cultivo y fusión de protoplastos	66
Cultivo de anteras	71
Germinación de polen	72
Rescate de embriones	73
Cultivo de callos	74
Embriogénesis somática	75
Variación somaclonal	78

CAPÍTULO 4

BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

Marcadores moleculares, una herramienta de apoyo en el Fitomejoramiento	83
Identificación de genes de importancia agronómica	85
Transformación genética	90

GLOSARIO	95
----------	----

BIBLIOGRAFÍA	99
--------------	----

PRÓLOGO

La Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México, a través de su Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento, publica en español esta recopilación de trabajos de investigación sobre los avances actuales en el mejoramiento genético de la especie *Rosa* spp., mediante el empleo de técnicas convencionales (hibridación, propagación asexual) y biotecnológicas (micropropagación, mutagénesis, marcadores moleculares), dirigida a estudiantes, técnicos, profesionistas, asociaciones de productores, viveristas e investigadores interesados en el tema, con la confianza de que este primer esfuerzo permita iniciar y fomentar trabajos formales interinstitucionales en estudios de Fitomejoramiento aplicados a ésta y otras especies con potencial ornamental, para incrementar el aprovechamiento de los recursos fitogenéticos nacionales. Cabe mencionar que en nuestro país se ha trabajado muy poco en el mejoramiento genético de rosa, no obstante la enorme importancia de este cultivo en el mercado comercial de la Floricultura.

En la primera parte de la obra, el lector reconocerá la importancia económica del cultivo de la rosa en el contexto nacional e internacional por sus volúmenes de producción y exportación, así como de sus usos y aplicaciones en el sector industrial, definiendo con precisión las características de calidad de los cultivares desarrollados, o por desarrollar, para satisfacer los gustos y preferencias del consumidor. Además, se incluye la clasificación actual del género *Rosa* (en subgéneros y secciones), su descripción botánica, distribución y clasificación en rosales silvestres (antiguos y modernos) propuesta por la Sociedad Americana de la Rosa con base en la historia de la domesticación de esta especie. En el siguiente capítulo se describen los mecanismos de polinización y las pruebas de viabilidad y calidad del polen, así como la botánica y otras características fisiológicas del fruto (aquenio), maduración de las semillas y tratamientos para su germinación. Se aborda también la genética poliploide y el origen citogenético de sus especies, y la enorme dificultad que ello implica para su identificación, así como aspectos

relacionados con la hibridación intergenérica e interespecífica que han llevado a cabo los fitomejoradores y productores para obtener materiales comerciales con caracteres deseables por transferencia de genes y sus implicaciones a nivel de meiosis. De manera adicional, en el tema de propagación asexual, se describen las ventajas y desventajas del uso de portainjertos de rosal y sus características de utilización dentro y fuera del invernadero. Se revisa el fenómeno de apomixis como un modo asexual de propagación en muchas especies, y se examinan los procesos, objetivos y perspectivas de su mejoramiento genético. Se definen claramente los criterios u objetivos genotécnicos deseables para la selección de materiales en los programas de mejoramiento genético de *Rosa* spp., todos ellos fundamentados en las necesidades cada vez más exigentes en la calidad de las rosas en el mercado comercial de la Floricultura. Varios autores ejemplifican y reportan los genes involucrados en la resistencia a enfermedades de importancia económica prioritaria, como la mancha negra del rosal, la cenicilla y el mildiú; en la floración recurrente, para asegurar la floración durante toda la estación; en la morfología de la flor (multi-pétalos o flores dobles) para la comercialización de flores de corte y en la ausencia de espinas en las rosas de corte y en la macetería.

En los capítulos subsecuentes se revisan los avances biotecnológicos desarrollados en rosa, se describen las técnicas y metodologías empleadas actualmente como herramientas alternativas para el mejoramiento convencional, sus resultados y experiencias derivadas de la investigación científica, así como sus usos potenciales y aplicaciones prácticas en áreas asociadas con la rápida propagación (acortamiento de los ciclos de germinación *in vitro*); cultivo de callos, anteras, polen; rescate de embriones (superando algunos de los problemas de esterilidad); embriogénesis somática; cultivo y fusión de protoplastos; mutagénesis *in vitro*; desarrollo de cultivares por medio de variación somaclonal; uso de marcadores moleculares y transformación genética.

Para concluir la obra, se visualiza la biotecnología en su conjunto (cultivo de tejidos, biología celular y molecular, ingeniería genética) como un área de enormes oportunidades para desarrollar nuevos cultivares de rosa en respuesta a los cambios en la demanda de este producto ornamental, además se anexa un glosario de términos para facilitar su comprensión.

M. en F. Thomas Héctor Norman Mondragón
Profesor-investigador de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEM

CAPÍTULO 1

GENERALIDADES DE LA ROSA

IMPORTANCIA DE LA ROSA

La rosa es el cultivo más importante del sector ornamental y representa uno de los productos principales en el mercado comercial de la Floricultura (Kaur *et al.*, 2007); también es económicamente trascendente como fuente de aceites esenciales para la industria de la perfumería y fragancias. En las empresas farmacéuticas su uso es notable debido a que se han encontrado en los extractos de rosa propiedades antiinflamatorias y radioprotectoras para el cuerpo humano (Winther *et al.*, 1999; Akhmadieva *et al.*, 1993, citados por Bruneau *et al.*, 2007). En los últimos años la florifagia ha despertado interés en la gastronomía, debido a las nuevas tendencias alimentarias del ser humano.

Algunas especies de rosa, como *Rosa gallica* y *R. damascena*, han sido utilizadas como esencia y agua de rosas, o bien, como mermelada de fruto de rosa, jarabes, té (Ercisli, 2005; Folta y Gardiner, 2009). Los frutos de los rosales son bien conocidos por su eficacia en el fortalecimiento de las defensas del cuerpo contra las infecciones, particularmente los resfriados. Los frutos, las hojas e incluso la raíz, hervidos con agua, son usados como diuréticos y como ingrediente común para combatir los resfriados; también son conocidos porque poseen un alto contenido en vitamina C (300-400 mg/100g), en comparación con algunas frutas y verduras; de igual forma, contienen otras vitaminas y minerales como los carotenoides, tocoferoles, bioflavonoides, ácidos, taninos, pectinas, azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y aceites esenciales (Chai y Ding, 1995; Demir y Ozcan, 2001; Kadakal *et al.*, 2002; Uggla *et al.*, 2003; Uggla *et al.*, 2005, citados por Ercisli, 2007b).

Un gran número de cultivares han sido desarrollados para satisfacer las necesidades actuales del mercado, tanto para flor de corte como para planta en maceta (plantas de jardín y recientemente plantas de interior) (Folta y Gardiner, 2009). Sin embargo, la exigencia del mercado cada vez es mayor en cuanto a la calidad de las rosas y, por lo tanto, el productor debería tener en cuenta los gustos

y preferencias del consumidor, por lo que es necesario buscar variedades altamente productivas que tengan una vida más larga en florero, variedades con fragancias más intensas, sin espinas, para un mejor manejo, resistentes a los daños mecánicos durante la recolección y el transporte, pero, sobre todo, que sean resistentes a plagas y enfermedades.

La rosa es una de las flores más vendidas en el mundo, seguida por los crisantemos, claveles, tulipanes y liliium. Ninguna flor ornamental ha sido tan estimada como la rosa.

Desde la década de los noventa, su liderazgo se ha consolidado debido, principalmente, a una mejora de las variedades, a la ampliación de la oferta durante todo el año y a su creciente demanda.

Uno de los principales mercados de consumo de flores frescas es Europa; Alemania es el principal importador de flores, con un valor aproximado de 1 064 millones de dólares en 2006, y un crecimiento promedio anual de 8%. Le sigue Reino Unido, con 984 018 mmd; Estados Unidos de América, 974 477 mmd; Holanda, 587 930 mmd; Francia, 506 135 mmd; Japón, 225 794 mmd; Italia, 203 836 mmd, y Suiza, 165 135 mmd (CORPEI-CICO, 2006).

Los principales países productores de rosa son Italia (1000 ha), Holanda (920 ha), Francia (540 ha), España (250 ha), Israel (220 ha) y Alemania (200 ha) (InfoAgro, 2014). En países sudamericanos la producción se ha incrementado en los últimos años, Colombia es el segundo exportador a nivel mundial con una participación de 14%, en comparación con Holanda, primer exportador de flor con 56% del total del comercio. En Colombia la principal especie exportada es el clavel, seguida por la rosa, con más de 60% del total exportado (Colombian Products Guide for Importers, 2004). Ecuador se ubica en el tercer sitio, sus principales mercados son: Estados Unidos (61%), Rusia (14%), Holanda (8%), España y Canadá (3%), que representan 90% de las exportaciones de rosa. En 2008, Ecuador exportó 105 mil toneladas con un valor de 546 millones de dólares (PROECUADOR, 2010).

Por su parte, México cuenta con 655 ha con un valor de producción de 890 millones de pesos (SIAP, 2010). A nivel nacional, el cultivo de rosa se concentra en 12 estados: Baja California Norte, Chiapas, Colima, Distrito Federal, Jalisco, Estado de México, Morelos, Puebla, Veracruz, Yucatán, Michoacán y Guerrero (ASERCA, 2008).

En el Estado de México la superficie florícola representa menos de 1% del total de la superficie agrícola sembrada, de donde se obtienen 118 millones de manojos y 15.9 millones de macetas, producción que en su mayoría se destina al mercado nacional, cuyo principal consumidor es el Distrito Federal. En cuanto a la exportación, los floricultores mexiquenses aportan 80% del total nacional de ornamentales, cuyos principales destinos son Estados Unidos y Canadá (GEM, 2008).

TAXONOMÍA

El género *Rosa* pertenece a la familia Rosaceae y está estrechamente relacionado con la manzana, la pera, el membrillo, la ciruela, la cereza, las moras y las fresas. La clasificación actual está basada en el sistema de Rehder (1940) (Wissemann, 2003, citado por Debener y Linde, 2009), en la cual hay cuatro subgéneros: *Hesperhodos*, *Hulthemia*, *Platyrhodon* y *Rosa* (*Eurosa*). En esta clasificación, el subgénero *Rosa* abarca alrededor de 95% de todas las especies, divididas en 10 secciones, como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1
Taxonomía convencional del género *Rosa*

<i>Grupo taxonómico</i>	<i>Núm. de especies en el grupo</i>	<i>Nivel de ploidía (x)</i>	<i>Especies representativas de cada sección</i>
Subgénero <i>Hesperhodos</i>	2	2	<i>R. stellata</i> Wooton
Subgénero <i>Hulthemia</i>	2	2	<i>R. persica</i> Michx. Ex Juss
Subgénero <i>Platyrhodon</i>	3	2	<i>R. roxburghii</i> . Tratt
Subgénero <i>Rosa</i> (<i>Eurosa</i>)			
Sección <i>Banksiae</i>	4	2, 4	<i>R. banksiae</i> ; <i>R. cymosa</i>
Sección <i>Bracteatae</i>	1	2	<i>R. bracteata</i> ; <i>R. clinophylla</i>
Sección <i>Caninae</i>	41	4, 5, 6	<i>R. canina</i> ; <i>R. rubiginosa</i> ; <i>R. corymbifera</i>
Sección <i>Carolinae</i>	7	2, 4, 6	<i>R. carolina</i> ; <i>R. foliosa</i>
Sección <i>Indicae</i> (<i>chinensis</i>)	5	2, 3, 4	<i>R. chinensis</i> (= <i>R. indica</i>); <i>R. gigantea</i> ; <i>R. odorata</i>
Sección <i>Cinnamomeae</i>	53	2, 4, 6, 8	<i>R. rugosa</i> ; <i>R. nuktana</i> ; <i>R. acicularis</i> ; <i>R. blanda</i>
Sección <i>Rosa</i> (<i>Gallicanae</i>)	9	3, 4, 5, 6	<i>R. gallica</i> ; <i>R. centifolia</i> ; <i>R. damascena</i> ; <i>R. alba</i>
Sección <i>Laevigatae</i>	1	2	<i>R. laevigata</i>
Sección <i>Pimpinellifoliae</i>	21	2, 4	<i>R. sericea</i> ; <i>R. foetida</i> ; <i>R. xanthina</i> ; <i>R. hugonis</i> ; <i>R. spinosissima</i>
Sección <i>Synstylae</i>	36	2, 3, 4, 5, 6	<i>R. moschata</i> ; <i>R. multiflora</i> ; <i>R. sempervivens</i> ; <i>R. wichuraiana</i> ; <i>R. setigera</i> ; <i>R. phoenicia</i>

Fuente: Wissemann (2003, citado por Ritz *et al.*, 2005).

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

El rosal es una planta arbustiva, de porte abierto, con ramas leñosas y normalmente espinosas. Las hojas son pinnadas, con estípulas, caducas, compuestas de cinco folíolos, ovaladas y con las nervaduras del envés sobresalientes.

Sus flores suelen ser grandes y vistosas, comúnmente solitarias o agrupadas en inflorescencias terminales (Álvarez, 2005). Tienen un receptáculo carnoso en forma cónica hueca que rodea muchos carpelos monospermos situados en su pared interna (Bañón *et al.*, 1993).

Las características morfológicas generales del género *Rosa* son:

- a) Raíz: rizoma estolonífero (figura 1a).
Tallo: arbusto de tallos semileñosos, casi siempre erectos (a veces rastreros), algunos de textura rugosa y escamosos, con notables formaciones epidérmicas de variadas formas, estípulas persistentes y bien desarrolladas (aguijones).
- b) Hojas: las hojas son compuestas, imparipinadas, generalmente de color verde oscuro brillante, con tres, cinco o siete folíolos de forma ovalada, con el borde dentado y a veces estípulas, es decir, pequeñas expansiones en la base de la misma hoja (figura 1b).
- c) Flores: generalmente aromáticas, completas y hermafroditas (androceo y gineceo juntos); regulares, con simetría radial (actinomorfas).
 - Perianto bien desarrollado.
 - Hipanto o receptáculo floral prominente en forma de urna (tálamo cóncavo y profundo) (figura 1c).
 - Cáliz dialisépalo, de cinco piezas de color verde. Los sépalos pueden ser simples, o a veces de forma compleja con lobulaciones laterales estilizadas (figura 1d).
 - Corola dialipétala, simétrica, formada de cinco pétalos regulares (o múltiplos de 5), a veces escotados, y de variados colores llamativos, también blancos. La corola suele ser “doble” o “plena” por transformación de los estambres en pétalos, mayormente en los cultivares.
 - Androceo compuesto por numerosos estambres dispuestos en espiral (varios verticilos), generalmente en número múltiplo de los pétalos (5x) (figura 1d).

- Gineceo compuesto por varios pistilos separados (policarpo apocárpico). Nectario presente, que atrae insectos para favorecer la polinización, predominantemente entomófila. Perigino, ovario súpero, numerosos carpelos uniovulados (un primordio seminal por cada carpelo) y libres (apocarpo), así cada carpelo produce un aquenio. Los estilos sobresalen de la abertura superior del hipanto.
 - Inflorescencias racimosas, formando corimbos; pero a veces se presentan flores solitarias por reducción
- d) Fruto: el producto fecundo de la flor es un aquenio.
- e) Infrutescencia: es un “fruto” compuesto por múltiples frutos secos pequeños (poliaquenio), conocida como cinodorrón, separados y encerrados en un receptáculo carnoso (hipanto) (Haserk, 1980) (figura 1e).

Figura 1
Principales estructuras morfológicas del género *Rosa*



a) Raíz



b) Hoja



c) Flor



d) Cáliz y androceo



e) Infrutescencia

DISTRIBUCIÓN

El género *Rosa* es endémico de las regiones templadas del hemisferio norte, incluyendo Norte América, Europa, Asia, Medio Oriente y una gran diversidad de especies encontradas en el occidente de China. La *Rosa* también está distribuida en áreas cálidas tales como Nuevo México, Iraq, Etiopía, Bangladesh y el sur de China. No hay especies endémicas de *Rosa* en el hemisferio sur.

CLASIFICACIÓN

Las rosas se pueden clasificar por el número de pétalos, el color o la forma de la flor (cuadro 2).

Cuadro 2
Clasificación hortícola de la rosa

<i>Por el número de pétalos</i>	
Sencillas	Tienen menos de ocho pétalos
Semidobles	Tienen de ocho a 20 pétalos
Dobles	Dobles moderadamente llenas: entre 21 y 29 pétalos Dobles llenas: entre 30 y 39 pétalos Dobles muy llenas: 40 o más pétalos
<i>Por el color</i>	
Monocolor	Tienen sólo un color
Bicolor	Tienen dos tonos de colores
Multicolor	Combinadas: pétalos que combinan dos o más colores distintos Jaspeadas: tienen pétalos con dos o más colores distintos, uno de los cuales forma rayas Pintadas: tienen colores salpicados de otro color
<i>Por la forma</i>	
Globular	Flor muy densa con muchos pétalos que forman un globo
Abierta	Posee flores con el centro abierto
Chata o plana	Flores con pocos pétalos, dispuestos en un plano horizontal
Cuarateada	Flores con pétalos internos que terminan en cuatro puntos o grupos
Roseta	Flores con numerosos pétalos y dispuestos horizontalmente
Pompón	Flores densas con pétalos cortos y numerosos dispuestos en plano horizontal

Fuente: Álvarez (2005).

La Sociedad Americana de la Rosa (American Rose Society) clasifica los rosales en: silvestres, antiguos y modernos, sistema basado en la historia de la domesticación de la Rosa (Álvarez, 2005).

Rosas silvestres

Los rosales silvestres son las especies que crecen en la naturaleza; de ellas descienden todas las demás rosas; esto ocurre a través de un proceso de selección y de continuas hibridaciones, por lo que se han estado consiguiendo continuamente más y mejores variedades: colorido, profusión y duración de las flores, mayor resistencia a plagas y enfermedades, aromas intensos, entre otros (Castilla, 2005). Las rosas silvestres son generalmente púrpuras, blancas, rosas o amarillas con cinco pétalos. Hay pocas con flores rojas y ninguna con tonos azules. El hábito de crecimiento varía de postrado a trepadora y las plantas florecen generalmente una vez al año (Caneva, 1998). Las especies que se encuentran dentro de esta clasificación son: *Rosa banksiae*, *R. canina*, *R. centifolia*, *R. damascena*, *R. eglantheria*, *R. gallica*, *R. pimpinellifolia* y *R. rugosa*.

Rosas antiguas

Los rosales antiguos son aquellos que existían antes del año 1867. Son híbridos de las especies silvestres y son poco conocidos en el mercado actual (Castilla, 2005), pero su uso ha ido en incremento, debido a su fortaleza y robustez, además de su resistencia a plagas y enfermedades (Caneva, 1998). A continuación se menciona cada clase de rosas antiguas y sus características.

Rosa Alba

Los rosales Alba son híbridos muy antiguos cuyo origen se calcula anterior al Imperio Romano y se considera que aparecieron como una derivación de la *R. canina* y la *R. damascena*. Las flores varían de un color blanco al rosado. Florece sólo una vez durante el verano. Sus frutos son grandes y rojos. Tienen un follaje

gris-azulado y sus tallos tienen escasas y uniformes espinas. Presentan resistencias a enfermedades y debido a su vigorosidad soportan sequías (López, 1981).



Disponible en <http://www.jardineria.pro/26-06-2008/plantas/arbustos/rosas-alba>
(consultada en octubre de 2009).

Rosa Damask

La historia cuenta que el origen de esta rosa es persa y luego se extendió por todo el mundo. Se cree que son una cruce de *R. phoenica* y *R. gallica*. Son mejor conocidas por la intensidad de su fragancia. Las flores son blancas o rosadas, en racimos. Florece una vez al año en verano. Presenta tallos arqueados (Álvarez, 2005).



Disponible en http://commons.wikimedia.org/wiki/file:Rosa_damascena_002.jpg
(consultada en octubre de 2009).

Rosa Gallica

Es originaria del centro y sur de Europa, principalmente de Francia. Presenta pocas flores generalmente reunidas en conjuntos de tres fragancias distintas. Tiene potencial medicinal por sus propiedades antiinflamatorias y astringentes (Caneva, 1998).



Disponible en <http://www.jardineria.pro/09-09-2009/plantas/rosa-gallica>
(consultada en octubre de 2009).

Rosa Bourbon

La primera apareció a principios de 1800 en la Isla de Bourbon, en el océano Índico. Probablemente son descendientes de la rosa China y Autumn Damask, presenta tolerancia a bajas temperaturas, posee flores globulares, perfumadas, con muchos pétalos. Florece en verano y otoño (Caneva, 1998).



Disponible en <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:wikimedia-bourbon-rose-louise-odier-DSCN9323.jpg> (consultada en octubre de 2009).

Rosa Centifolia

Se cree que son una cruce de *R. damascena* y *R. alba*. Son flores perfumadas con muchos pétalos arracimados, por su aspecto globular tienen la apariencia de col. La mayoría produce flores rosas y tienen sépalos largos y brillantes, y hojas verde oscuro. Normalmente son arbustos altos con crecimiento arqueado y florecen en verano (Álvarez, 2005).



Disponible en http://commons.wikimedia.org/wiki/file:Rosa_centofilia_002.jpg (consultada en octubre de 2009).

Híbridos Perpetuos

Los Híbridos Perpetuos tienen una gran descendencia, la mayoría de ellas de *R. bourbons* e híbridos de Tés. Florecen en verano y otoño, presentan flores dobles y fragantes, con un amplio rango de color que va de los rosas a los rojos, hojas de color verde oliva (Caneva, 1998).



Disponible en http://commons.wikimedia.org/wiki/file:Rosa_'La_Reine'.jpg
(consultada en octubre de 2009).

Rosa de China

Pequeños o medianos arbustos. Los tallos son frecuentemente débiles para soportar un grupo de flores con una fuerte fragancia. Con el paso del tiempo, sus flores cambian de color, algunas van de amarillo, o rosa suave, a rosa fuerte o rojo (Caneva, 1998).



Disponible en <http://austintexas.gov/sites/default/files/RoseoldBlush.jpg>
(consultada en octubre de 2009).

Rosas modernas

La era de las rosas modernas fue establecida a partir de 1867 con la introducción del primer híbrido de la rosa de Té “La France”, derivado de cruces entre Híbrido Perpetuo y rosas de Té contenía características de *R. damascena*, *R. moschata*, *R. chinensis*, *R. gigantea* y *R. gallica* (Marriot, 2003). Este grupo constituye 95% de los rosales que se cultivan en la actualidad (Castilla, 2005). Al final del siglo xx más de 10 000 híbridos de la rosa de Té habían sido mejorados con gran éxito. En este grupo también se incluyen los rosales ingleses creados por David Austin de Inglaterra, caracterizados por sus colores rosados, blancos, cremas y lilas; las flores son dobles con muchos pétalos arrellados (Álvarez, 2005). Enseguida se mencionan los tipos de rosas modernas.

Híbrido de Té

Son las rosas más cultivadas y comercializadas. Es el tipo más comercial, normalmente es la rosa que se suele regalar para San Valentín en sus múltiples colores. Son ideales para el corte. Florecen generalmente dos veces al año. No obstante, cada año se presentan nuevas variedades con un tiempo de floración más largo. Son sensibles al frío y en invierno requieren protección (Caneva, 1998).



Disponible en <http://empresapaisajista.blogspot.mx/2009/12/tipos-de-rosales-y-su-cultivo.html>
(consultada en octubre de 2009).

Arbustiva

Son grandes matas. Exhiben rosas simples o dobles, en solitario, o bien, en racimos. La mayoría son reflorescentes, es decir, vuelven a crecer a lo largo del año. Las rosas brotan en verano y otoño. Existe un gran número de variedades de rosas arbustivas (Caneva, 1998).



Disponible en <http://fichas.infojardin.com/rosas/rosales-arbustivos-rosas-arbustivas-rosales-de-parque.htm>
(consultada en octubre de 2009).

Floribunda

Es la rosa más comercial después del Híbrido de Té y, a diferencia de éstas, son más pequeñas y nacen en racimos, por lo cual son más coloridas, muy brillantes, rústicas y floríferas. Los racimos tienen generalmente de tres a 25 rosas simples o completamente dobles. Florecen de verano a otoño. De porte bajo de unos 50 centímetros de altura, pero hay ejemplares de hasta un metro.



Disponible en http://commons.wikimedia.org/wiki/file:Rosa_Love01.jpg
(consultado en octubre de 2009).

Grandiflora

Este tipo de rosa se caracteriza por ser muy parecida al Híbrido de Té y a la Floribunda, pero de un tamaño mucho menor, crecen en racimos igual que la última. Una característica destacada es el gran crecimiento que puede llegar a alcanzar durante el primer año de cultivo, su energía de crecimiento hace posible que pueda plantarse en los jardines sin cuidado insistente, por lo que alcanza fácilmente una altura superior a 1.80 metros en el primer año de plantación. Las Grandifloras reúnen las ventajas de los Híbridos de Té y de Floribundas, en especial los colores anaranjados. Indistintamente son representaciones importantes como la persistencia de sus colores, la forma de engrandecerse y la duración de las flores, la textura de sus pétalos hace posible que sean considerados como los rosales más modernos.



Disponible en <http://fichas.infojardin.com/rosas/rosales-grandifloras-rosa-grandiflora.htm>
(consultada en octubre de 2009).

Polyantha

La rosa Polyantha es muy parecida a la Floribunda. Crecen en ramilletes compactos, espesos y compuestos entre siete y 15 rosas pequeñas, que pueden ser simples o dobles. Florecen entre verano y otoño. Se plantan en grupos para hacer bordes. Sus características son similares a las Floribundas (Ganga Network, 2014).



Disponible en <http://fichas.infojardin.com/rosas/rosales-polyantha-rosa-polyantha.htm>
(consultado en octubre de 2009).

Miniatura

La rosa Miniatura proviene de rosales pequeños que apenas alcanzan 30 o 40 centímetros. Son reflorescentes y con ramilletes formados normalmente entre tres a 11 rosas diminutas, simples a dobles, las cuales crecen entre verano y otoño. Sus hojas son muy pequeñas. Hay muchísimas variedades que se cultivan cada vez más, ya que son perfectas para cualquier lugar, sobre todo para casa, como cualquier planta común (Ganga Network, 2014).



Disponible en <http://fichas.infojardin.com/rosas/rosales-miniatura-rosal-enano-rosal-mini-rosas-miniaturas.htm> (consultado en octubre de 2009).

Sarmentosa

Sus rosas son idénticas a las de los rosales arbustivos. Se pueden plantar en casa, en tiestos o jardineras, no será necesaria una superficie grande para su plantación. Se puede incluir a los rosales sarmentosos dentro de los trepadores, ya que son casi idénticos. Son rosales trepadores, vigorosos, con tallos largos y fuertes. Crecen principalmente en verano, en racimos de tres a 20 rosas simples a completamente dobles. Son los más utilizados para ser plantados en muros, vallas, glorietas y árboles. Florecen una vez al año en verano (Ganga Network, 2014).



Disponible en http://commons.wikimedia.org/wiki/file:Rosa_'knockout'_8601.jpg
(consultado en octubre de 2009).

CAPÍTULO 2

MEJORAMIENTO GENÉTICO CONVENCIONAL DE LA ROSA

Los seres humanos dependen, directa o indirectamente, de las plantas; de ellas se derivan alimentos, fibras textiles, fármacos, funciones de ornato, entre otros; por lo anterior, no sorprende que el hombre se haya preocupado, desde hace miles de años, por obtener tipos de plantas superiores para satisfacer sus necesidades.

Es difícil establecer cuándo el hombre inició, de forma consciente, el mejoramiento de las plantas, sin embargo, se tienen registros de que los asirios y babilónicos (700 años a.C.) polinizaban artificialmente palmas datileras. Por su parte, los indígenas americanos realizaron un excelente mejoramiento del maíz. En 1716, Cotton Mather observó, por primera vez, la hibridación natural al cruzar maíces de diferente color. Tiempo después, en 1717, Thomas Fairchild produjo artificialmente la primera planta híbrida de clavel.

Por lo tanto, el objetivo principal del Fitomejoramiento genético es incrementar la producción y la calidad de los productos agrícolas por unidad de superficie en el menor tiempo, con el mínimo esfuerzo y al menor costo posible, esto se logra mediante la obtención de nuevas variedades o híbridos de alto potencial, es decir, con el mejoramiento genético de las plantas se espera contribuir sustancialmente a una mayor productividad agrícola; sin embargo, esto no se puede llevar a cabo simplemente con el potencial genético de las diversidades, sino mediante la obtención de variedades que estabilicen su producción a través de la resistencia o tolerancia a malezas, a daños causados por plagas y enfermedades, a la sequía, al calor, frío, viento o a otros factores negativos. Además, estas diversidades deben poseer mayor eficiencia fisiológica en la absorción de nutrientes; deben ser capaces de aprovechar mejor el agua, los fertilizantes y, en general, ser tolerantes a determinado factor ambiental, características que tienden a controlar las fluctuaciones extremas de los rendimientos.

En este capítulo se dan a conocer los aspectos anteriores relacionados con el mejoramiento genético del rosal y los criterios para la selección de materiales para ello.

REPRODUCCIÓN SEXUAL

Polen y polinización

La polinización es la transferencia de polen de las anteras de una flor a los estigmas de otra flor sobre una planta diferente (polinización cruzada), o sobre la misma planta (autopolinización). El polen es transportado a los estigmas por medio de vectores como el viento, el agua o insectos (abejorros, abejas u otros), o por el contacto directo entre las anteras y los estigmas (Kevan y Baker, 1983; Van Went and Willemse, 1984; Richards, 1986; Proctor *et al.*, 1996, citados por MacPhail y Kevan, 2009).

La polinización en el género *Rosa* se da por dos mecanismos: la autopolinización (autogamia), forma por la cual las partes femeninas y masculinas interactúan en una sola flor y ocurre cuando el polen entra en contacto con los estigmas de las flores en la misma planta, permitiendo producirlas de manera individual en aislamiento de otras plantas. Otro mecanismo de polinización es la alogamia o xenogamia, que es la polinización entre flores de diferentes individuos de una misma especie a través de vectores externos (Richards, 1986; Proctor *et al.*, 1996, citados por MacPhail y Kevan, 2007).

La polinización cruzada es el principal modo de reproducción de este género, esto es, por medio de la xenogamia; no obstante, las rosas muestran un alto grado de heterocigocidad por el gran número de cruzamientos que se han hecho y por las discrepancias reportadas en cuanto a la autoincompatibilidad de varias especies de rosa por los diferentes niveles de ploidía que se presentan en este género (Kevan *et al.*, 1990; Ueda y Akimoto, 2001; Kevan, 2003; MacPhail, 2007, citados por MacPhail y Kevan, 2009).

Las rosas silvestres producen normalmente polen altamente viable, sin embargo, la viabilidad puede variar con el nivel de ploidía que tienen, e incluso puede variar significativamente en la misma planta o en la época del año en que el polen es producido (Gudin *et al.*, 1991).

En las rosas modernas el polen tiene una baja viabilidad, debido a una variedad de errores producidos durante la división celular meiótica (Capítulo 4). Esta baja viabilidad permite a un Té Híbrido, incluso en condiciones de cruza artificiales, producir alrededor de cinco a 15 semillas, y una sucesiva polinización puede incrementar significativamente el número de aqenios obtenidos.

Se ha reportado que un grano de polen maduro guarda nutrientes que son utilizados para la germinación, no obstante, son insuficientes para que el tubo polínico atraviese el estilo, por lo tanto, el grano de polen depende de los nutrientes disponibles en el pistilo. La sustancia más importante es la sacarosa, la cual tiene un doble efecto: regulador de la presión osmótica de los granos de polen y nutriente para el crecimiento del tubo polínico. Por consiguiente, el número de granos y de anteras varía de acuerdo con el genotipo, y esta variación está asociada principalmente al nivel de ploidía que presentan las especies (Derin, 2000 y Werlemark, 2000, citados por Günes *et al.*, 2005); además, existen diferencias considerables entre especies puras (con una meiosis regular) y los híbridos interespecíficos (meiosis irregular) (Günes *et al.*, 2005). La polinización toma de 12 a 24 horas, proceso en el que el polen pasa por el tubo polínico, llega al ovario y fertiliza el óvulo (Jacob y Ferrero, 2003).

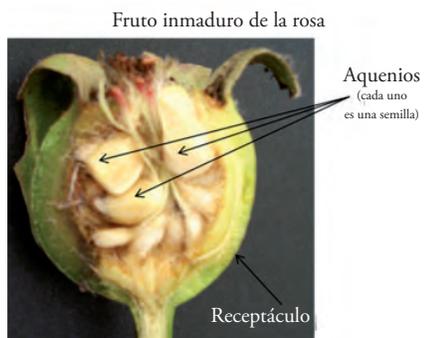
La viabilidad y calidad del polen se ha probado por medio del cultivo *in vitro* de algunas especies de la sección *Caninae* (Günes *et al.*, 2005), al cual le incorporan ciertos minerales externos para una buena germinación del polen, tales como el ácido bórico (H_3BO_4), nitrato de calcio ($Ca(NO_3)_2$), nitrato de potasio (KNO_3), sulfato de magnesio ($MgSO_4$) y ácido giberélico (AG_3). Además, se hace un conteo del número de anteras así como de los granos de polen, que varían de acuerdo con el genotipo que se esté estudiando. La capacidad de germinación puede fluctuar de 0 a 100%, según la especie, por lo que la prueba más apropiada para determinar su capacidad germinativa es *in vitro* (Gudin *et al.*, 1991), y el medio de cultivo enriquecido con sacarosa a 15% ha permitido tener los mejores resultados en cuanto a la germinación del polen (Günes *et al.*, 2005). La viabilidad del polen se puede llegar a perder rápidamente a lo largo de varios días si los granos se dejan sin protección a temperatura ambiente. Por lo tanto, deben utilizarse técnicas para mantener la viabilidad por largos periodos y ofrecer una gran flexibilidad a los mejoradores cuando la floración de alguno de los progenitores sea asincrónica. Los granos de polen maduros tienen el potencial de retener la viabilidad por periodos largos bajo condiciones de almacenamiento favorables (Khosh-khui *et al.*, 1976, citado por Zlesak *et al.*, 2007). El polen puede ser criopreservado (en nitrógeno líquido a $-196\text{ }^\circ\text{C}$) por 12 meses. Sin embargo, técnicas como el almacenamiento a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ o $4\text{ }^\circ\text{C}$ no son ideales para la viabilidad del polen, ya que puede disminuir rápidamente su poder germinativo en un corto periodo (Khosh-khui *et al.*, 1976, citado por Marchant *et al.*, 1993).

Algunos de los factores que influyen en la viabilidad del polen son: la estación del año, el tiempo de floración después de la vernalización y la temperatura durante la microgametogénesis (Gudin *et al.*, 1991; Gudin, 1992; Visser *et al.*, 1977, citados por Zlesak *et al.*, 2007). Generalmente el polen colectado a principio de la temporada (antes del inicio de las temperaturas cálidas del verano y del primer ciclo de floración después de la vernalización) tiene una mayor viabilidad (Gudin *et al.*, 1991; Gudin, 1992, citados por Zlesak *et al.*, 2007).

Maduración de semillas y germinación

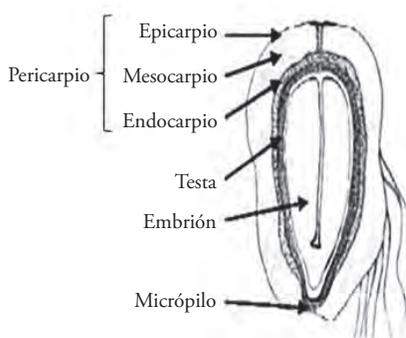
Las semillas del rosal son aquenios (figura 2), frutos individuales consistentes de un pericarpio (epi, meso y endocarpio), testa y embrión (figura 3).

Figura 2



Corte longitudinal de una infrutescencia de *Rosa* sp., que muestra los aquenios (Imagen: Mónica D. Bautista Puga).

Figura 3



Representación esquemática de la morfología de un aquenio de *Rosa* sp., vista longitudinal (Zlesak, 2007).

Los aquenios de *Rosa* poseen una dificultad en términos de germinación debido a su fuerte dormancia, que podría durar varios meses, dependiendo de las condiciones ambientales (Beinaert, 1936; Ferwerda, 1956; Huxley, 1992; Hartman y Kester, 2002, citados por Younis *et al.*, 2007). Se presenta una dormancia fisiológica

provocada por inhibidores químicos endógenos, como es el caso del ácido abscísico (ABA) (Yambe, 1992, citado por Zlesak, 2007), que son producidos en el pericarpio y la testa; también el ácido giberélico (AG_3) o citoquininas (Ueda, 2003). Se ha examinado la cantidad de ABA en los aquenios del híbrido cv. Crimson Glory, donde se determinó que la mayor alta concentración de ABA se encontraba en la testa ($1.38 \mu\text{g g}^{-1}$), seguida por el pericarpio ($0.85 \mu\text{g g}^{-1}$), y luego el embrión ($0.18 \mu\text{g g}^{-1}$) (Bo *et al.*, 1995, citado por Zlesak, 2007), como dormancia física dada por restricciones físicas para germinar, tal como el grosor del endocarpio (Zlesak, 2007).

La capa más interna del pericarpio en el aquenio es el endocarpio, y es la más impermeable de la semilla, por lo que esto constituye una barrera física para la penetración del agua que impide que el embrión se pueda expandir (Zlesak, 2007). El grosor y la capacidad de germinación de la semilla son influenciadas por la temperatura durante el desarrollo del aquenio (Gudin *et al.*, 1990, citado por Zlesak, 2007). Sin embargo, la disminución del grosor del endocarpio parece estar relacionada con el aumento de la temperatura y con el desarrollo del embrión, y esto puede ser explicado por la competencia nutricional entre el embrión y la capa de la semilla (Gudin, 1999).

De forma convencional, los aquenios de rosa tardan dos años en germinar, ya que necesitan de condiciones climáticas cálidas y frías para que el embrión madure (Younis *et al.*, 2007). Se ha utilizado la estratificación y la escarificación de la semilla para maximizar la germinación. La estratificación es un periodo de exposición a bajas temperaturas y ha sido la más utilizada para estimular la germinación en *Rosa*. Este proceso fisiológico se ha realizado con materiales como el agar, toallas de papel, *peat moss*, perlita, arena, vermiculita y musgo, y los que mejor resultado han dado son el *peat moss*, la arena y el musgo (Anderson y Byrne, 2007). Por ejemplo: *Rosa multiflora* requiere alrededor de seis semanas de refrigeración húmeda a 3°C para una óptima germinación, pero otras especies, como *R. rugosa* y *R. hugonis*, requieren de cuatro a seis meses; *R. blanda*, 10 meses de estratificación previa a la germinación; *R. caninae* germina cuando la semilla se mantiene en un cuarto húmedo a temperatura ambiente por dos meses, más otros dos meses a 0°C (Hartmann y Kester, 2001).

En la escarificación se han aplicado métodos químicos, físicos abrasivos y por enzimas (Heit, 1967; Benton 1988; Yambe y Takeno, 1992, citados por Anderson y Byrne, 2007). Se ha empleado el ácido sulfúrico, ácido nítrico y agua (Younis

et al., 2007), donde se encontró que el efecto del agua a 98 °C/24 h no tuvo un resultado significativo, indicador de que el tipo de dormancia en las semillas es físico, ya que es impermeable al agua, por el grosor del mismo. Con el ácido nítrico tampoco se obtuvieron buenos resultados, ya que tuvo un efecto corrosivo en la semilla y quizá haya dañado al embrión, por lo que no se recomienda. Con el tratamiento de ácido sulfúrico (H_2SO_4) se pudo romper la dormancia de las semillas, sumergiéndolas por 60 segundos en el ácido, ya que por más tiempo la capacidad germinativa decrecía. Por consiguiente, un factor que se debe tomar en cuenta es el genotipo que se está estudiando, ya que la capacidad germinativa puede variar de 0 a 100% y, con base en eso, se escoge el método más apropiado para su germinación, además de que ésta se ve afectada por su genética y por los factores ambientales en los que se desarrolló, ya que la temperatura juega un papel importante en el desarrollo del embrión y en el grosor del endocarpio (Gudin *et al.*, 1990; Uggla, 2004, citados por Hoşafçı *et al.*, 2005).

GENÉTICA DE LA ROSA

El género *Rosa* es uno de los más importantes entre las plantas ornamentales en términos de economía e historia cultural de la humanidad (Ritz *et al.*, 2005). El género comprende alrededor de 200 especies ampliamente distribuidas en las regiones templadas y subtropicales del hemisferio norte (Rehder, 1949, citado por Wisseman y Ritz, 2005); sin embargo, algunos autores señalan que son más de 100 (Akasaka *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 2009). Estas diferencias son consecuencia de la dificultad para identificar los materiales, ya que las rosas pueden variar mucho en apariencia, lo que causa que algunos autores realicen la división de una especie en múltiples especies, mientras otros divergen las que están más estrechamente relacionadas con un solo tipo. Además de que hay un número de sinónimos y cultivares que producen confusión (MacPhail y Kevan, 2009). Esto se debe a la hibridación que se ha dado a lo largo del tiempo, considerada como una de las mayores causas de confusión taxonómica (Linnaeus, 1753; Crépin, 1884, 1986, citados por Joly *et al.*, 2006).

El número básico de cromosomas en *Rosa* es $x=7$, y aproximadamente la mitad de las especies son diploides ($2n=2x=14$). También hay triploides ($2n=3x=21$),

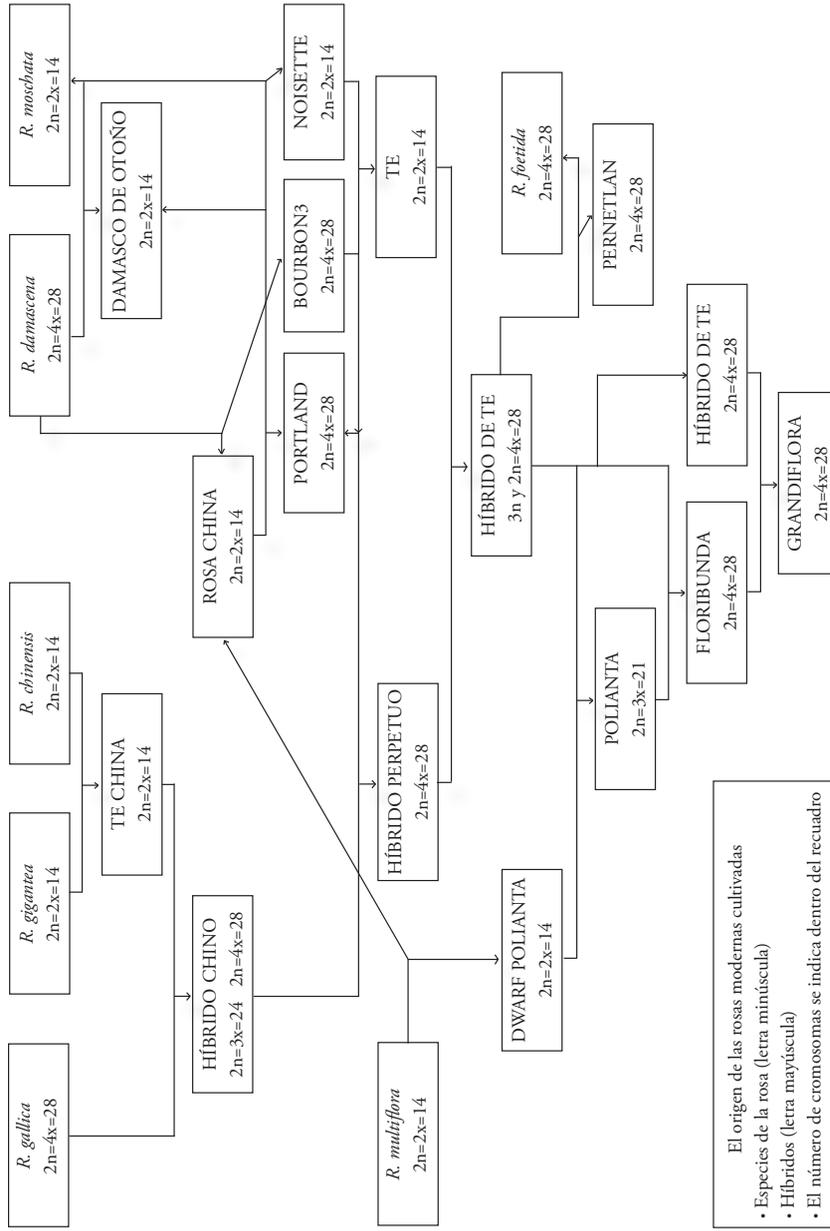
tetraploides ($2n=4x=28$), pentaploides ($2n=5x=35$), hexaploides ($2n=6x=42$), y hasta octaploides ($2n=8x=56$) (Fatih, 2003); los diploides son la mayoría de las rosas silvestres, y los tetraploides la mayoría de las rosas modernas (Erlanson, 1933; Krussmann, 1981, citados por Debener y Linde, 2009). La aneuploidía (pérdida o ganancia de cromosomas) es rara en las rosas (Robles, 1995; Rowley, 1960, citado por Yakoya *et al.*, 2000)

Wisseman (2003a, citado por Ritz *et al.*, 2005) menciona que el género *Rosa* está dividido en cuatro subgéneros: *Hesperhodos*, *Hulthemia*, *Platyrhodon* y *Eurosa*. Los tres primeros son monotípicos, con un nivel de ploidía $2n$. El subgénero *Eurosa* alberga casi 95% de todas las especies, divididas en 10 secciones, como se muestra en el cuadro 1, las que cuentan con el mayor número de especies son *caninae* y *cinnamomeae*.

Sin embargo, de todas las especies mencionadas se originaron las rosas modernas cultivadas, producto de cruces de ocho o 10 especies (Akasaka *et al.*, 2003). El resultado de este cruzamiento fueron las rosas modernas, entre las que sobresalen las Poliantas ($2n=2x$), Híbridos de Té ($2n=3x, 4x$), Floribundas ($2n=3x, 4x$) y las Miniaturas ($2n=2x, 3x, 4x$) (Yokoya *et al.*, 2000) (figura 4).

Cabe señalar que las especies de rosa, base de las variedades actuales, son *R. gallica* ($2n=4x=28$), *R. gigantea* ($2n=2x=14$), *R. chinensis* ($2n=2x=14$), *R. damascena* ($2n=4x=28$), *R. moschata* ($2n=2x=14$), *R. multiflora* ($2n=2x=14$) y *R. foetida* ($2n=4x=28$). A éstas les añadimos *R. indica* ($2n=2x, 3x, 4x$), *R. manetti* y *R. canina* ($2n=4x, 5x, 6x$), que se suelen utilizar como portainjertos (López, 1981).

Figura 4
Árbol genealógico que muestra el origen de las rosas modernas



El origen de las rosas modernas cultivadas

- Especies de la rosa (letra minúscula)
- Híbridos (letra mayúscula)
- El número de cromosomas se indica dentro del recuadro

Fuente: modificado de López (1981).

Meiosis

En general, la mayoría de las especies diploides tienen una meiosis regular con siete cromosomas bivalentes. La poliploidía es común en el género *Rosa* y tiene efectos pronunciados sobre la fertilidad y caracteres de herencia, de tal manera que es caracterizado por una única meiosis (Nybom *et al.*, 2005). En la mayor parte de las especies con el mismo nivel de ploidía, la megaspora y la microspora transmiten la misma cantidad de material genético a sus descendientes, que da como resultado una progenie con los mismos rasgos de sus progenitores (Werlema, 2003, citado por MacPhail y Kevan, 2009).

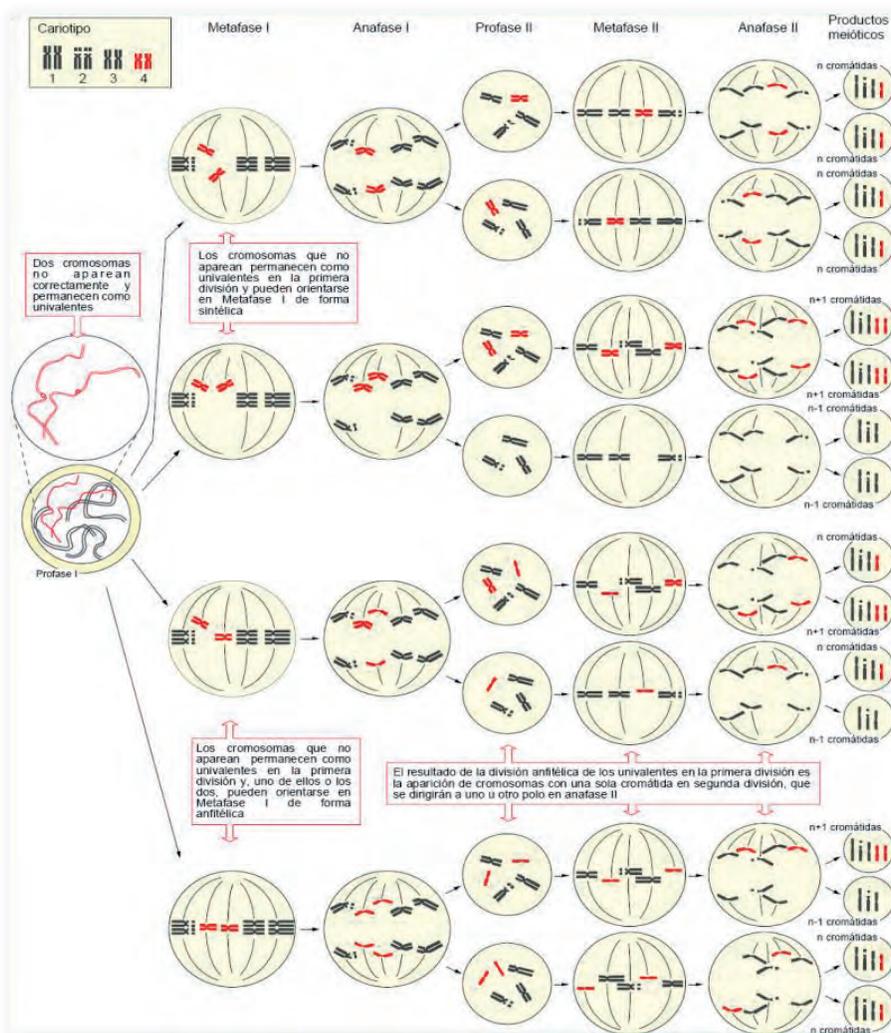
Sin embargo, dentro del género *Rosa*, la sección *Caninae* forma un grupo bien definido de poliploidía conocido como “Dogroses”. Todas las especies de esta sección son poliploides e incluyen tetraploides ($2n=4x=28$), pentaploides ($2n=5x=35$) y hexaploides ($2n=6x=42$); y de origen alopoliploide (individuos o especies formadas por cruzamiento de dos especies diferentes con uno de sus genomios duplicados para obtener la homología normal de sus cromosomas) (Robles, 1995), que tienen una formación regular de cromosomas bivalentes (Werlema y Nybom, 2009). La meiosis canina es un sistema heterógamo (cuando un gameto masculino transmite un genotipo o genotipos diferentes a los transmitidos por los gametos femeninos) (Sánchez-Monge, 1970), con los granos de polen haploides y los óvulos tetraploides (Blackburn y Harrison 1921; Täckholm, 1920, 1922, citados por Ritz *et al.*, 2005).

Sólo siete cromosomas (derivados de siete bivalentes) son transmitidos a través de los granos de polen, mientras que los óvulos contienen 21, 28 o 35 cromosomas (derivados de siete bivalentes y 14, 21 o 28 univalentes), dependiendo del nivel de ploidía. Sin tomar en cuenta el nivel de ploidía, únicamente siete cromosomas bivalentes son formados en la primera división meiótica, y los cromosomas restantes permanecen exclusivamente como univalentes; éstos no son incluidos en los granos de polen viables, los cuales contienen solamente siete cromosomas divididos. En contraste, todos los univalentes son transmitidos a una de las células hijas en la meiosis femenina, y son eventualmente incluidos en los óvulos viables, los cuales contienen 21, 28 o 35 cromosomas en los diferentes niveles de ploidía (Werlema y Nybom 2005; Li *et al.*, 2005; Nybom *et al.*, 2005; Debener y Linde, 2009).

En la metafase de la meiosis materna de una especie pentaploide ($2n= 5x= 35$), siete cromosomas bivalentes se alinean en el plano ecuatorial, mientras que el resto de los cromosomas permanecen como 21 cromosomas univalentes.

En la anafase I sólo los bivalentes divididos dan lugar a dos tipos de células, una contiene siete cromosomas de los bivalentes junto con los 21 univalentes, y otra solamente con los siete cromosomas resultado de los bivalentes. En la anafase II, los univalentes y los bivalentes divididos dan como resultado dos células con siete cromosomas, los cuales son subsecuentemente perdidos. En la meiosis paterna, los univalentes y bivalentes se dividen en la anafase I. En la anafase II, los bivalentes hijas se dividen otra vez en forma normal, pero los univalentes hijas son incapaces de dividirse por segunda vez. En la tétrada resultante, los restos de los univalentes hijas a veces aparecen dentro de las células del polen y las hacen incapaces de funcionar correctamente (figura 5). Por consiguiente, la viabilidad del polen dentro de la sección ha sido reportada por ser bastante baja (Werlemark y Nybom, 2005).

Figura 5
Aspectos básicos del comportamiento cromosómico de los univalentes en la meiosis



Fuente: Giráldez (s.f.).

En la figura 5 se puede apreciar lo siguiente: la Meiosis ($2n=4x=28$) presenta una transmisión irregular de cromosomas del óvulo y del polen. En la Megasporogénesis los dos genomas se alinean en la placa ecuatorial en la Metafase I para formar bivalentes. Los otros 14 cromosomas permanecen desapareados como univalentes en uno de los polos. La separación en la Anafase I resultará en una célula con 21 cromosomas (siete cromosomas de los bivalentes, más todos los 14 univalentes) y una célula con 7 cromosomas. En la siguiente división (Metafase II), los univalentes se dividen con los 21 cromosomas de los bivalentes resultantes de las dos células, de los cuales sobreviven dos células con siete cromosomas (Anafase II), que serán perdidos. Una de las células con 21 cromosomas será desarrollada en el saco embrionario. En la Microsporogénesis hay una formación bivalente en la Metafase I, donde los 14 univalentes permanecen en la placa ecuatorial, con las cromátidas separadas, y se mueven hacia los polos en la Anafase I. En la segunda división (Metafase II), los cromosomas de los cromosomas bivalentes se dividen normalmente, pero los univalentes se quedan atrás, lo que da como resultado una tétrada consistente de cuatro células con siete cromosomas junto con un micronúcleo de univalentes (Anafase II). En la fertilización, tanto el polen con siete cromosomas como el micronúcleo, no se unen con los 21 cromosomas del óvulo, reestructurando el número tetraploide (Werlemark y Nybom, 2009).

HIBRIDACIÓN

La hibridación es un término utilizado para describir el proceso de cruce de dos variedades de plantas genéticamente diferentes para obtener una tercera variedad, con las características deseadas por ambos progenitores, denominada híbrido (Lawrence, 2003).

Hibridación intergenérica

Uno de los parientes más cercanos de la rosa es *Hultemia pérsica*, una especie xerófita nativa del Medio Oriente clasificada como *Rosa pérsica* (Cairns, 2000, citado por Zlesak, 2007). Los mejoradores han tratado de infiltrar el color rojo

carmesí de la base de los pétalos en *Rosa* (figura 6). La introgresión (acción y efecto del retro-cruzamiento espontáneo reiterado de un híbrido interespecífico con una o ambas especies parentales) (Sánchez-Monge, 1970) es una característica de *H. pérsica* en *Rosa*, y ha sido un desafío debido a las barreras reproductivas y dificultad de crecimiento de *H. pérsica* y de los híbridos. La obtención de retrocruzas híbridas con *Rosa* ha sido difícil, por lo menos una planta de 50 retrocruzas típicamente posee la base distintiva del pétalo (Chris Warner, 2002, citado por Zlesak, 2007). Los híbridos intergenéricos se han intentado regenerar únicamente por medio de fusión de protoplastos (Mottley *et al.*, 1996, citado por Zlesak, 2007).

Figura 6
***Rosa pérsica*, base rojiza de los pétalos, característica de esta especie**



Fotografías: Jim Sproul (2007).

Hibridación interespecífica

La hibridación interespecífica es un importante recurso de variación en el mejoramiento ornamental, ya que por medio de esta cruce se pueden incorporar caracteres deseables por transferencia de genes; por ejemplo: resistencia a enfermedades, a plagas, a sequía, etc.; en el caso de la rosa, algunos rasgos de importancia son: la morfología de la flor, color y fragancia, floración recurrente, follaje brillante, etc. (Debener 2003; De Cock *et al.*, 2007, citados por Werlemark y Nybom, 2009).

Las cruces entre individuos con diferente nivel de ploidía han sido menos exitosas debido al desarrollo de desórdenes entre el embrión y el endospermo. Este problema ha sido seriamente obstaculizado por la introducción de germoplasma –proveniente de especies silvestres diploides (2x)– en las rosas cultivadas, que normalmente son tetraploides (4x) (Nybon *et al.*, 2005).

Indudablemente, la hibridación puede ocurrir entre muchas taxa de rosa, y la hibridación interespecífica es frecuentemente usada en el mejoramiento, a nivel comercial, de plantas de cultivares de rosa. Esto se da principalmente entre genotipos tetraploides, donde el resultado de los híbridos es fácil y se genera un buen vigor y fertilidad en la variedad (Spethmann y Feuerhann, 2003, citados por Nybon *et al.*, 2005), aunque la formación multivalente toma lugar en la meiosis (Ma *et al.*, 2000, citado por Nybon *et al.*, 2005).

Sin embargo, otros autores consideran que las cruces en el mejoramiento genético de la rosa son importantes por varias razones: las especies diploides (2x) y pentaploides (5x) generalmente son mejores como progenitores y cuando son cruzadas con especies de diferente nivel de ploidía (Spethmann y Feuerhann, 2003, citados por Nybon *et al.*, 2005). Además, los híbridos con diferente nivel de ploidía son mucho más similares a su progenitor, el cual ha contribuido con un gran número de cromosomas. En el caso de las “Dogroses”, la dirección de la cruce es importante cuando las especies son del mismo nivel de ploidía, debido al efecto favorable de la herencia materna, que ha sido reportado por muchos autores (Werlemark, 2000; Werlemark y Nybom, 2001, citados por Nybom *et al.*, 2005). Los genotipos triploides, que resultan de una progenie, se deben a la cruce entre diploides y tetraploides, y normalmente son estériles, aunque algunos genotipos triploides producen una relativa proporción alta de gametos haploides o diploides, utilizados en programas de mejoramiento. Cuando se hacen cruces de

triploides con tetraploides, utilizan el triploide como progenitor masculino para que produzca un mayor número de semillas (Nybon *et al.*, 2005).

Las cruzas entre especies diploides pueden producir también híbridos con una formación bivalente regular, pero estos híbridos con frecuencia son altamente estériles, debido, probablemente, al entrecruzamiento de cromosomas homólogos incompletos durante la meiosis.

PROPAGACIÓN ASEXUAL: VENTAJAS Y DESVENTAJAS

Muchas de la rosas destinadas para flor de corte, de jardín o de paisajismo son comúnmente propagadas por estacas, aunque la mayoría de los cultivares modernos de rosa son utilizados como portainjertos, y comúnmente provienen de *R. indica-major*, *R. manetti*, *R. canina*, *R. multiflora* y *R. hybrida* cv. Natal Briar (cuadro 3).

Los rasgos de importancia en un portainjerto de rosal son: compatibilidad con una amplia gama de cultivares; fácil injerto de yemas en cualquier época del año; buena ramificación; sistema de raíces flexible; tolerancia a diferentes tipos de suelos; vigor de la planta; resistencia a enfermedades; número reducido de espinas; podas reducidas y fácil propagación. Varios tipos de patrón son propagados de forma vegetativa, lo que significa que cuando una enfermedad aparece en el material, puede ser transmitida a las siguientes generaciones.

No obstante, cada productor decide qué tipo de portainjerto es más apto para el área donde quiera establecerlo, pues algunos prefieren plantas resistentes a nemátodos, como el portainjerto “Fortuniana”, u otros que el portainjerto sea tolerante a climas fríos, como *R. multiflora* y *R. canina*. Para el cultivo en invernadero se prefiere principalmente el portainjerto “Manetti”, debido a que tiene una reducida latencia para la producción de flores durante todo el año (Zlesak, 2007). Además, la selección del patrón está siempre ligada al tipo de variedad y condiciones del cultivo.

Cuadro 3
Características de los principales portainjertos utilizados en rosa

<i>Característica</i>	<i>R. indica</i>	<i>R. manetti</i>	<i>R. canina</i>	<i>cv. Natal Briar</i>
Resistencia al clima y suelo	Resiste bien la sequía y suelos alcalinos. Mejor adaptación a condiciones de invernadero.	Poco resistente a la sequía y suelos alcalinos. Requiere suelos sueltos con pH de 6-7.	Buena resistencia al frío y longevidad. Fácil adaptación a todos los suelos y climas.	Llega a soportar temperaturas de hasta 6°C. Sensible a altos niveles de boro en el agua o tierra. Requiere de más agua que otros patrones.
Morfología y fenología	Sistema radicular bien desarrollado, capaz de explorar un gran volumen del suelo. Favorece la vegetación a lo largo del año, principalmente en invierno.	Sistema radicular fino, abundante y superficial.	Se adapta a ciclos vegetativos cortos, y hay obtención de flores en corto tiempo.	Patrón propagado vegetativamente, es más productivo, da tallos largos y se recupera con facilidad.
Interrelación con otras variedades	Buena afinidad con diversos cultivares.	No presenta problemas de incompatibilidad con las actuales variedades cultivadas y tiene la capacidad de exaltar el color de las flores.	Uno de los portainjertos más utilizados. Es ideal para el cultivo de flor de corte al aire libre.	Fijación de color parecido a Manetti.

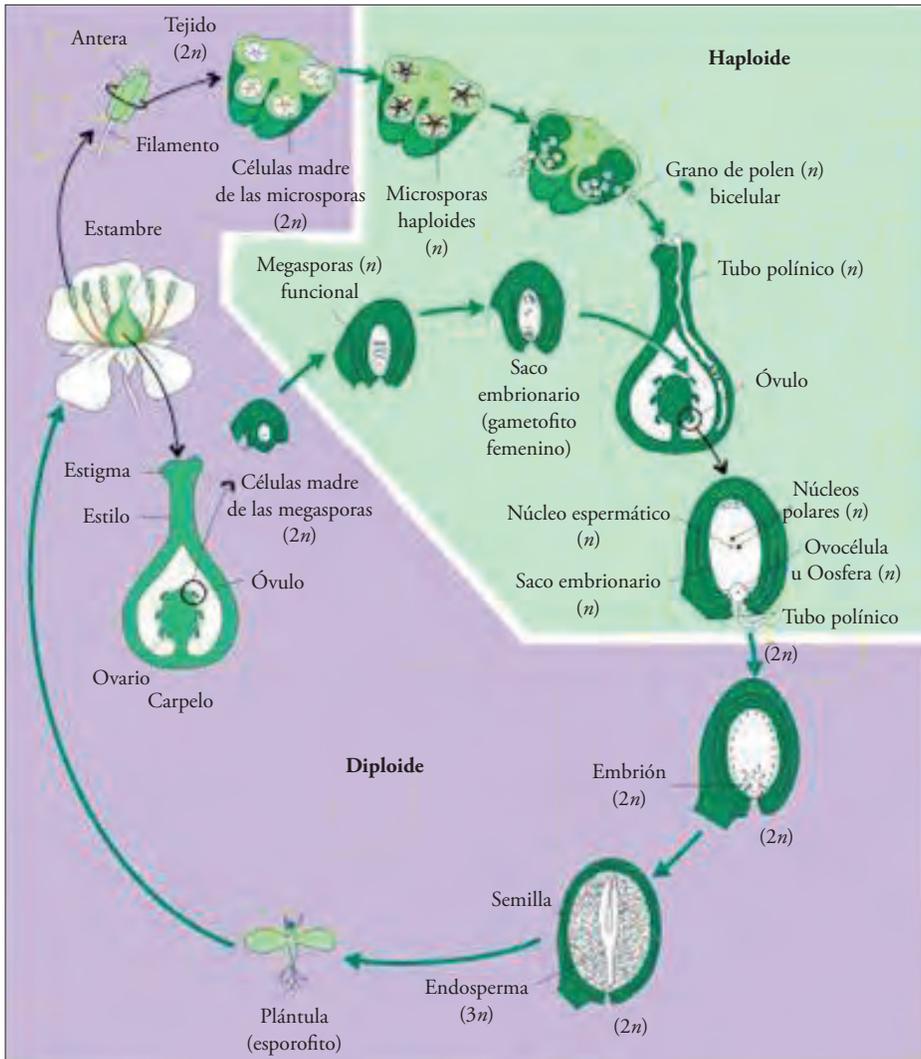
Fuente: Bañón *et al.* (1993); Miranda (1975), información tomada del sitio web: Blog jardinería (2014).

APOMIXIS

Algunas plantas con flores presentan un modo asexual de propagación llamado apomixis. En la reproducción sexual, normalmente la formación de una semilla requiere de la fecundación: un gameto masculino (n) se fusiona con la ovocélula (n) para originar al cigoto ($2n$). A partir de este cigoto se forma el embrión. En este tipo de reproducción, la meiosis provoca la recombinación genética de ambos progenitores y genera gametos haploides. En la fecundación se fusionan, de manera aleatoria, un gameto masculino con uno femenino para originar un nuevo individuo con una constitución genética única.

En contraste, la apomixis (Apo=sin; mixis=mezcla) es la reproducción clonal que perpetúa la composición genética de una planta o grupo de individuos (Quero *et al.*, 2010), elude la ruta sexual y evita la reducción meiótica y la fecundación. Por lo tanto, este carácter es conocido como apomixis gametofítica o agamospermia, donde la producción de semilla botánica ocurre sin la fusión de los gametos, con lo que produce descendencia vía partenogénesis de células huevo ameióticas (diploides) o nucelares (somáticas diploides), cuya sucesión es copia fiel de la madre; esto es, la semilla botánica no es garantía de nuevos genotipos, como ocurre en la reproducción sexual (figura 7) (Vielle Calzada *et al.*, 1996; Ortiz *et al.*, 2004; Carneiro *et al.*, 2006; Quero *et al.*, 2010).

Figura 7
Las rutas biológicas de la reproducción sexual y apomítica



Fuente: tomado del sitio web Blogodisea (2014).

Durante la sexualidad, una célula de la nucela del óvulo se diferencia como célula madre de la megáspora y, luego de sufrir un proceso de meiosis, da origen a cuatro megásporas haploides. Tres de estas megásporas degeneran y la cuarta da origen a la formación de un saco embrionario luego de una serie de mitosis, donde todos los núcleos celulares están reducidos (n). La ovocélula y los núcleos polares del saco son fecundados por los núcleos generativos (n) del polen para dar origen al cigoto y al núcleo primario del endosperma, respectivamente. El cigoto origina al embrión a través de sucesivas mitosis. La apomixis consiste en la formación de un embrión a partir de una célula no reducida (que no ha sufrido mitosis). En algunos casos hay formación de un megagametofito con células no reducidas, cuya ovocélula ($2n$) genera un embrión por partenogénesis (apomixis gametofítica). En otros casos, el embrión es generado directamente a partir de una célula de la nucela en un proceso similar a la embriogénesis somática (embrionía adventicia) (Ortiz *et al.*, 2004).

La apomixis ha sido observada en muchas especies y es más común en las familias *Graminae*, *Asteraceae* y *Rosaceae* (Crespel *et al.*, 2001). Por una parte, la apomixis ocurre generalmente a través de la familia *Rosaceae* y dentro del género *Rosa*, este proceso se asocia con especies de la sección *Caninae* (Carneiro *et al.*, 2006).

Por otra parte, la apomixis gametofítica se relaciona siempre con la poliploidía. En general aparece en especies que presentan razas con bajos niveles de ploidía (usualmente diploides), que se reproducen por sexualidad, y otras de mayor nivel de ploidía (por ejemplo: tri, tetra o pentaploides) se propagan por apomixis (Ortiz *et al.*, 2004).

Otro dato importante es que la apomixis permite a las plantas poliploides mantener la producción de semilla viable, proporciona una estrategia de escape a la esterilidad, debido al desbalance cromosómico del embrión: endospermo (Asker, 1992, citado por Quero *et al.*, 2010). La descendencia producida por individuos apomícticos será apomíctica en gran proporción; mientras que una proporción (50%) de la descendencia de plantas sexuales, en cruza rígidamente, será apomíctica (Savidan y Pernés, 1982, citados por Quero *et al.*, 2010). En un estudio realizado por Crespel *et al.* (2001) se confirmó el origen opamíctico de *R. wichuraiana* y *R. gigantea*, a través de marcadores moleculares AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

En otro estudio realizado por Werlemark (2000, citado por Carneiro *et al.*, 2006), se menciona que la meiosis inestable y la poliploidía están presentes en todos los miembros de la sección *Caninae*, la cual, en la mayoría de los casos, conduce a una marcada influencia morfológica por parte del progenitor materno. A través de marcadores moleculares tipo RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), se encontró que las especies utilizadas no tenían herencia paterna.

Mejoramiento genético de especies apomícticas

Actualmente sólo existen programas de mejoramiento genético en algunas especies forrajeras de la familia Graminae; sin embargo, todas las plantas apomícticas facultativas pueden ser mejoradas genéticamente mediante cruzamientos convencionales, ya que producen determinados sacos embrionarios meióticos que posibilitan la hibridación y selección. Por el contrario, en las plantas apomícticas obligadas, que se reproducen clonalmente, la hibridación y el análisis de segregación son imposibles; no obstante, los genotipos apomícticos obligados con características deseables se pueden utilizar como donadores de polen, esto debido a que los gametos masculinos son completamente normales y porque un gran número de especies apomícticas son altamente heterocigotas; los cruzamientos entre individuos (utilizados como progenitores femeninos) y apomícticos (empleados como dadores de polen) pueden conducir a la generación de progenies F1 variables, donde es posible seleccionar. Sin embargo, la selección deberá basarse en individuos con un alto grado de expresión de la apomixis, esto conducirá a la obtención de variedades estables (Ortiz *et al.*, 2004).

Los procesos básicos de un programa de mejoramiento genético en especies apomícticas incluyen: a) recolección y disponibilidad de recursos genéticos del centro de origen de la especie, con el fin de aumentar la base genética disponible e identificar introducciones sexuales o altamente sexuales; b) caracterización morfológica y citológica de las poblaciones (identificación de individuos diploides y poliploides); c) definición del tipo reproductivo de los individuos de la colección; d) producción de individuos sexuales poliploides en el laboratorio, con el fin de aprovechar la variabilidad genética mediante la recombinación meiótica en la

producción de la célula huevo y la recombinación genética resultante de la fusión de gametos; e) programa de cruzamientos con objetivos bien definidos, para lograr el mayor avance genético, y f) programas de evaluación agronómica de los materiales en conjunto, con la ampliación de la base genética y aprovechamiento de la descendencia sexual (Ortiz *et al.*; Quero *et al.*, 2010).

El objetivo final de un programa de mejoramiento de una especie apomíctica, del cual ha sido posible obtener recombinación genética, es la identificación en la población segregante de los genotipos superiores, con reproducción completamente (o casi completamente) apomíctica, que puedan ser transformados en cultivares mediante su multiplicación por semillas, es decir, clonar genotipos superiores híbridos permitiría a los productores agrícolas obtener altos rendimientos año tras año, usando parte de las semillas cosechadas sin pérdidas en la producción por la segregación. De igual forma, se podrían obtener y propagar híbridos interespecíficos e intergenéricos que posibilitarían el desarrollo de genotipos mejor adaptados a los diversos ambientes. Asimismo, se facilitaría el uso de transformantes, considerando que una planta transgénica apomíctica fijaría inmediatamente el nuevo carácter y se convertiría en cultivar después de su multiplicación (Ortiz *et al.*, 2004).

CRITERIOS PARA LA SELECCIÓN DE MATERIALES EN LA MEJORA GENÉTICA

Resistencia a enfermedades

Las rosas son susceptibles de un gran número de enfermedades, el incremento en la resistencia del hospedante es una de las mayores prioridades para muchos mejoradores.

Las principales enfermedades fungosas que se presentan en el rosal son: mancha negra del rosal (*Diplocarpon rosae*), cenicilla (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*), roya del rosal (*Phragmidium* spp.), mildiu (*Peronospora sparsa*), mancha de la hoja (*Cercospora* spp.) y marchitamiento por verticilium (*Verticillium albo-atrum* o *V. dahliae*) (Hattendorf *et al.*, 2004). La principal enfermedad bacteriana en rosa es la agalla de la corona (*Agrobacterium tumefaciens*) (Horst, 1983, citado por Zlesak, 2007).

La mancha negra del rosal (figura 8) es considerada como la enfermedad más seria del rosal (Dobbs, 1984, citado por Whitaker *et al.*, 2007). Esta afección puede ser reconocida como manchas más o menos circulares de color negro, con márgenes flaqueados de aproximadamente 15 milímetros de diámetro en la superficie de las hojas (Walker *et al.*, 1996). Dentro de los síntomas incluye una lesión y clorosis de las hojas (Horst y Cloyd 2007, citado por Whitaker y Bradeen, 2010), inclusive las hojas infectadas producen una gran cantidad de etileno y la planta se defolia (Horst, 1983, citado por Uggla y Carlson-Nilsson, 2005). “La fuente de las infecciones proviene de conidios producidos en estructuras llamadas acérvulos (figura 8), o bien, ascosporas que se forman en las hojas caídas (generadas en apotecios). Los apotecios no son importantes si en la región no ocurren inviernos crudos, como generalmente suceden en México” Bayer (s/a), “Mancha negra”, disponible en http://www.bayercropscience.com.mx/bayer/cropscience/bcsmexico.nsf/id/Man_negraDiseases_BCS (consultado en noviembre de 2010)..

La mancha negra del rosal puede ser encontrada en algunas especies silvestres (Blechert y Debener, 2005) y en la mayoría de las rosas modernas (Walker *et al.*, 1996); sin embargo, algunas especies silvestres (Svejda and Bolton, 1980; Wenefrida and Spencer, 1993; Byrne *et al.*, 1996; Debener *et al.*, 1998; De Vries and Dubois, 2001, citados por Uggla y Carlson-Nilsson, 2005), como algunos cultivares del grupo Old Garden Roses, poseen un alto grado de resistencia (Carlson-Nilsson, 2002, citado por Uggla y Carlson-Nilsson, 2005).

Además de la aparición de razas patogénicas, la resistencia en la rosa se ha complicado por la falta de información sobre la naturaleza y la herencia genética. El único gen de resistencia descrito es el alelo *Rdr1*, y es de herencia dominante y raza-específica; fue encontrado en *Rosa multiflora*, seleccionado y duplicado con colchicina e hibridado en rosas de Té tetraploides (Von Maleck y Debener 1998, citados por Whitaker *et al.*, 2007). Este trabajo fue el primero en documentar la evidencia de un gen por gen y de la interacción del hospedante-patógeno para la mancha negra del rosal (Whitaker *et al.*, 2007). Los marcadores moleculares, como el caso de los SSR (Secuencias Simples Repetidas) han sido de gran utilidad para la localización del gen de resistencia a la mancha negra del rosal (Debener y Linde, 2009).

Figura 8
Síntomas, acérvulo y conidios de la enfermedad *Diplocarpon rosae*



(a) Síntomas de la mancha negra.
Fotografía: Poulsen Rosen (2014).



(b) Acérvulo de *Diplocarpon rosae* sobre tejido foliar. Fotografía: Technische Universität München (2014).



(c) Conidios de *D. rosae*.
Fotografía: Center for Invasive Species and Ecosystem Health (2014).

Se ha llegado a afirmar que la cenicilla (*Sphaerotheca pannosa* Wallr. Ex Fr. Lév.) es la más seria de las enfermedades fungosas, tanto en flores de corte como de jardín. El crecimiento blanco del hongo ataca hojas jóvenes, yemas y flores. Esta enfermedad reduce la producción de flores y causa un debilitamiento de las plantas (figura 9). Los Híbridos de Té son generalmente muy susceptibles, mientras que

los individuos de *Rosa wichurianas* son más resistentes (Horst 1983, citado por Uggla y Carlson-Nilsson, 2005). Bender y Coyier (1984, citados por Uggla y Carlson-Nilsson, 2005) identificaron cinco razas diferentes de *S. pannosa*, y más tarde Linde y Debener (2003, citados por Uggla y Carlson-Nilsson, 2005) aislaron e identificaron ocho razas de *S. pannosa* y describieron un gen de resistencia (*Rpp1*), que fue mapeado en una población diploide de híbridos de *R. multiflora* con marcadores SCAR (Regiones Amplificadas Caracterizadas y Secuenciadas) estrechamente ligados a los AFLP (Linde *et al.*, 2004).

Figura 9
Síntomas y conidios de la enfermedad *Sphaerotheca pannosa*



(a)



(b)



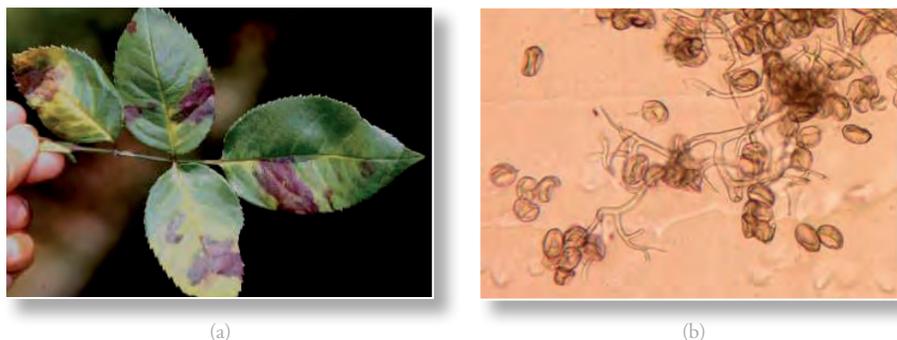
(c)

a) y b) Síntomas de la cenicilla en hoja y pedúnculo floral (*Sphaerotheca pannosa* Wallr. Ex Fr. Lév.), c) Conidios de la cenicilla (*S. pannosa*). Fotografía: Mónica D. Bautista Puga.

Por otra parte, un gen de la proteína microbiana *Ace-AMPI* y neomicín fosfotransferasas (*npt II*), fue introducido en *R. hybrida* cv. Carefree Beauty, mediante transformación genética, vía *Agrobacterium tumefaciens*, con la cepa GV3101; 500 plantas transgénicas se analizaron mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), 62% dio positivo a la presencia del transgen, estas plantas transgénicas fueron inoculadas con conidios de *S. pannosa* y mostraron una mayor resistencia a la cenicilla (Li *et al.*, 2003).

El mildiu (*Peronospora sparsa*) produce esporangios con forma característica de limón, su micelio es cenocítico y no produce esporas móviles (figura 10). *P. sparsa* es el agente causal del mildiu vellosa en rosa. Ataca todas las estructuras de la planta. Los primeros síntomas aparecen sobre las hojas como manchas marrones a púrpuras; la planta, como defensa, defolia las hojas infectadas. En el tallo, los síntomas iniciales se presentan como manchas aceitosas que pueden extenderse de 20 a 30 centímetros de longitud y pueden evolucionar en chancros. La temperatura óptima de germinación de las esporas es 18 °C; a 5 °C no germinan y a 27 °C se mueren. Los esporangios en condiciones ideales esporulan en 3 días en el envés de las hojas. Las esporas sobreviven 1 mes en hojas secas. Los esporangios o fragmentos miceliales son transportados por el aire, principalmente. La entrada en el huésped es a través de los estomas; luego inicia su crecimiento micelial en forma endofítica (el micelio se desarrolla en el interior de la planta). Posteriormente emerge por medio de los estomas, liberando grandes cantidades de esporangios por el viento, y reinician el ciclo de infección. Para que el proceso de germinación ocurra, se requiere una temperatura de 18 °C y necesariamente debe haber una película de agua libre en la superficie del huésped. El periodo de incubación es de 8 días y requiere de una humedad relativa de 85 a 100% para el desarrollo de la infección (Syngenta, 2007, citado por Quinche, 2009).

Figura 10
Síntomas y esporangios del hongo *Peronospora sparsa*



a) Síntomas de *Peronospora sparsa* en la hoja del rosal. Fotografía: Baldo's Sactorose (2014); b) Esporangios de *P. sparsa*. Fotografía: Collage of Agriculture. Consumer and Environmental Sciences (2014).

Las enfermedades fúngicas son la mayor limitación en el cultivo de rosas de corte, en invernaderos y en transportación alrededor del mundo (Koning-Boucoiran *et al.*, 2009). El desarrollo de cultivares resistentes es una alternativa para reducir el uso de agroquímicos requeridos para controlar las enfermedades.

Floración recurrente

La floración recurrente es uno de los factores clave para el éxito del rosal como cultivo ornamental, ya que le permite a genotipos superiores florecer a través de toda la estación. Afortunadamente, la herencia del gen de la floración recurrente es relativamente sencilla y es controlada por un *locus* principal en genotipos homocigotos recesivos. Este rasgo fue probablemente adquirido por introgresión de *R. chinensis* y *R. odorata* a principios del siglo XIX. Esta característica del rosal evita los requerimientos de vernalización para la inducción de brotes florales y le permite a la planta florecer sin vernalización y, por consiguiente, extender su periodo de floración (DeVries y Du Bois, 1984; Debener 1999; Crespel *et al.*, 2002; Dugo *et al.*, 2005, citados por Debener y Linde, 2009). Se ha observado que el gen principal (no descrito), que rige la floración recurrente, se

encuentra en el cv. Golgilocks, el cual es el resultado de la cruce entre el híbrido China y el híbrido Rugosa (Semeniuk, 1971a, 1971b; Svejda, 1974, citados por Zlesak, 2007). Sin embargo, un bajo número de genes son los que parecen estar involucrados en regular la expresión de la floración recurrente, por lo que ésta se puede producir en diferentes ciclos de florecimiento con una relativa sincronía (cv. Therese Bugnet), mientras otros tienden a una floración libre cuando las plantas tienen, al menos, alguno de los botones abiertos en la mayor parte del periodo de crecimiento (Zlesak, 2007).

Morfología de la flor

Esta característica para el mejoramiento de la rosa, es un aspecto importante para la comercialización de flores de corte, especialmente las multipétalos o flores dobles. La morfología de la flor es afectada por un rango de parámetros que incluye el número de pétalos, que va desde los cinco (flores sencillas) hasta los 40 o más (flores dobles); el tamaño y forma de los pétalos; número de estambres, número y forma del estilo y del ovario. Las flores dobles se deben a un gen dominante (Debener, 1999; Debener y Mattiesch, 1999), confirmado por otros investigadores (Crespel *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2005a; Linde *et al.*, 2006; Shupert *et al.*, 2007, citado por Debener y Linde, 2009).

Espinas

La mayoría de las rosas de la especie con crecimiento arbustivo y las plantas trepadoras tienen espinas (Ali, 2003, citado por Zlesak, 2007). Mientras las espinas tienen un cierto valor ornamental en las rosas de jardín, son usualmente negativas en las rosas de corte y en la macetería (Chaainin, 2003, citado por Debener y Linde, 2009). Algunos estudios han mostrado que las espinas en los tallos son herencia de un solo gen dominante (Debener, 1999; Shupert *et al.*, 2007, citados por Debener y Linde, 2009), y que son independientes de las espinas en los peciolos (Lal *et al.*, 1982; Crespel *et al.*, 2002; Zhang, 2003, citados por Debener y Linde, 2009). En contraste, las rosas sin espinas se expresan en

los descendientes de *R. multiflora*, y parece ser debido a un solo gen recesivo, sin embargo, la herencia de este rasgo se encontró en cultivares tetraploides (Debener, 1999, citado por Zlesack, 2007).

CAPÍTULO 3

MEJORAMIENTO GENÉTICO POR CULTIVO DE TEJIDOS

La biotecnología en rosa se remonta a 1970, cuando se realizó el primer cultivo *in vitro* (Elliot, 1970, citado por Debener y Linde, 2009), desde entonces las técnicas *in vitro* han sido ampliamente utilizadas por la rápida multiplicación de cultivares, la producción de plantas libres de enfermedades, así como por ser un prerrequisito para la ingeniería genética en rosa, sobre todo para mejorar o insertar características deseables a fin de aumentar su valor comercial, a través de la creación de nuevos colores de flor, tamaño y, sobre todo, para mejorar la calidad de la flor, principalmente con la ampliación del tiempo de conservación (Pati, 2002).

Aunque muchas de las características fueron introducidas por el mejoramiento convencional, había limitaciones con esta técnica, primero porque la reserva genética era limitada, segundo, porque las cruces distantes eran incompatibles por el nivel de ploidía, y tercero, porque el crecimiento uniforme y la floración sincrónica fueron poligénicas (Rout *et al.*, 2006). Por consiguiente, la biotecnología ha emergido como una importante alternativa al mejoramiento convencional de la rosa, ya que se ha encontrado con muchos usos potenciales y prácticos en áreas asociadas con la rápida propagación, cultivo de callos, anteras, polen, embriogénesis somática, fusión de protoplastos, mutagénesis *in vitro*, desarrollo de cultivares por medio de variación somaclonal y transformación genética, además de que la biotecnología puede superar algunos de los problemas de esterilidad por medio del rescate de embriones y por la acortación de los ciclos de germinación *in vitro* (Canli y Kazaz, 2009). La biotecnología en rosa lleva consigo el cultivo de tejidos, biología celular y molecular, y esto ofrece oportunidades para desarrollar nuevos materiales para hacer frente a los cambios de la demanda del producto.

Las estrategias de la ingeniería genética son altamente deseables para la rosa, ya que facilitan la modificación (o introducción) de un solo gen sin la interrupción o limitación de alguno ya existente, así como que las características del genotipo sean de valor comercial como objetivo de la nueva variedad (Rout *et al.*, 1999).

MICROPROPAGACIÓN DE ROSA

La micropropagación o cultivo *in vitro* es un procedimiento con una enorme capacidad de desarrollar plántulas en un corto lapso, además de generar plantas libres de enfermedades y, sobre todo, de producir propágulos en aproximadamente un año (Pati *et al.*, 2006; Ozel y Arslan, 2006).

Varios estudiosos utilizan como explante para la micropropagación segmentos nodales de tallos de rosa, los cuales deben contener yemas axilares para su proliferación (Kumar *et al.*, 2004; Al-Khalifah *et al.*, 2005; Nak-Udom *et al.*, 2009), además de meristemos y yemas apicales (Rout *et al.*, 2006).

La micropropagación se lleva a cabo en cuatro fases:

- 1) Desinfección del explante, donde se utiliza hipoclorito de sodio, etanol y Tween 20 (Carelli y Echeverrigaray, 2002; Ozel y Arslan, 2006; Razavizadeh y Ehsanpour, 2008; Kay Thi Oo *et al.*, 2008; Nak-Udom *et al.*, 2009), y en algunos casos una solución de cloruro de mercurio (HgCl_2) a 0.1% (Kumar *et al.*, 2004; Al-Khalifah *et al.*, 2005), y posteriormente se realizan varios lavados con agua destilada esterilizada para que el explante esté listo para ser cultivado a un medio de cultivo. La incubación del cultivo se realiza a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, y en un fotoperiodo de 16 horas de luz y ocho de oscuridad, en un lapso aproximado de cuatro semanas, posteriormente los nuevos brotes son trasplantados a un medio de enraizamiento.
- 2) Proliferación de brotes, para su establecimiento se utiliza un medio de cultivo de Murashige & Skoog (MS) (1962, citado por Ozel y Arslan, 2006), compuesto por sacarosa, en concentraciones que van de 30 a 40 gr L^{-1} ; se observan diferentes respuestas en la iniciación de los brotes y el crecimiento (Bresan *et al.*, 1982, citado por Razavizadeh y Ehsanpour, 2008). No obstante, se ha encontrado una interacción significativa entre la concentración de la sacarosa con la del genotipo (Al-Khalifah *et al.*, 2005). El medio de cultivo también lleva reguladores de crecimiento vegetal (RCV) en diferentes concentraciones. Los RCV que principalmente se utilizan son las auxinas [Ácido indolbutírico (IBA, 0.1 mg L^{-1}), Ácido indol acético (IAA, 0.1 mg L^{-1}), Ácido naftalenacético (NAA, 0.1 a 2.0 mg L^{-1}), así como citoquininas [Tidiazurón (TDZ, 0.05 a 5.0 mg L^{-1}), Kinetina (KIN, 0.2 mg L^{-1}), Benciladenina (BA, 0.03 a 5.0 mg L^{-1}), Bencilaminopurina (BAP, 0.5 a 5.0 mg L^{-1}), Isopentiladenina (2-iP, 0.5

mg L⁻¹), ambos tipos de RCV funcionan en la división celular y formación de órganos (Arzate-Fernández, 2001; Carelli y Echeverrigaray, 2002; Iqbal *et al.*, 2003; Roy *et al.*, 2004; Al-Khalifah *et al.*, 2005; Ozel y Arslan, 2006; Drefahl, 2007; Razavizadeh y Ehsanpour, 2008; Kay Thi Oo *et al.*, 2008; Nak-Udom *et al.*, 2009).

Los efectos positivos en cuanto a la proliferación de brotes van de acuerdo con los RCV utilizados, ya sea solos o combinados, y también según la concentración de los mismos. En promedio, el número de brotes reportados ha sido de dos a siete, con 3 mg L⁻¹BAP (siete brotes) (Kay Thi Oo *et al.*, 2008); con 0.05 mg L⁻¹ TDZ + 0.2 mg L⁻¹ KIN + 0.1 mg L⁻¹ NAA + 3% sacarosa (seis brotes) (Ozel y Arslan, 2006); con MS + 1 mg L⁻¹ BAP + 0.1 mg L⁻¹ GA₃ (cuatro brotes) (Hasegawa, 1979, citado por Drefhal *et al.*, 2007); con 3 mg L⁻¹ BA + 0.003 mg L⁻¹ NAA + 3% sacarosa (tres brotes; Nak-Udom *et al.*, 2009), y con 3 mg L⁻¹ BA (dos brotes) (Carreli y Echeverrigaray, 2002).

Del mismo modo, se ha observado que el BA promueve un mayor número de brotes en comparación con la KIN; igualmente, al incrementar la concentración de BA, aumenta el número de brotes, pero la elongación de los mismos decrece (Carelli y Echeverrigaray, 2002).

El uso de TDZ y KIN en bajas concentraciones tiene un efecto positivo en la regeneración de brotes (Ozel y Arslan, 2006); asimismo, Hasegawa (1979, citado por Drefahl, 2007) afirma que la baja concentración de GA₃ en combinación con BAP incrementa la formación de brotes.

Cada uno de los trabajos realizados muestra una variación en cuanto al número de brotes obtenidos en cada tratamiento, con las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, pero se ha hecho notar que el genotipo del material vegetal a utilizar es muy importante para la multiplicación y elongación de brotes, y este es un factor que tiene que ver con su comportamiento *in vitro* (Carreli y Echeverrigaray, 2002; Iqbal *et al.*, 2003).

- 3) Enraizamiento, fase en la que con la regeneración de brotes se hace un subcultivo, cuyos brotes pasan a un nuevo medio de cultivo, destinado a la inducción y formación de raíces. En esta fase se utiliza un medio MS, sin embargo, la concentración del mismo varía según sea el caso. Se ha utilizado el MS a 100, 50 y 25% de concentración de los macro y microelementos, el MS puede llevar o no RCV; los principales RCV son las auxinas, ya que promueven la formación

de raíz. No obstante, el éxito del enraizamiento depende principalmente de la concentración del ms (Douglas *et al.*, 1989, citado por Ozel y Arslan, 2006). Los RCV utilizados en esta fase son el NAA (0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 mg L⁻¹), IAA (0.1, 0.5, 1.5 mg L⁻¹) e IBA (0.1, 0.5, 1.0 mg L⁻¹).

Asimismo, se ha encontrado que la concentración de las sales del ms afecta el desarrollo de las raíces pero, al suplementarle una baja cantidad de IAA, mejora la formación de raíces (Bresan *et al.*, 1982, citado por Razavizadeh y Ehsanpour, 2008).

De igual manera, para la formación de raíces se ha reportado que en un ms a 25% (¼) de su concentración sin RCV se obtuvo arriba de 75% de raíces, pero estas se mostraron largas, delgadas y fibrosas (Nak-Udom *et al.*, 2009).

También se ha obtenido buena formación de raíces en un ms 50% (½) + 1 mg L⁻¹ de NAA con un promedio de cuatro a cinco raíces (Kay *et al.*, 2008), del mismo modo, con un ms ½ sin RCV se obtuvo un promedio de cinco raíces por explante (Ozel y Arslan, 2006).

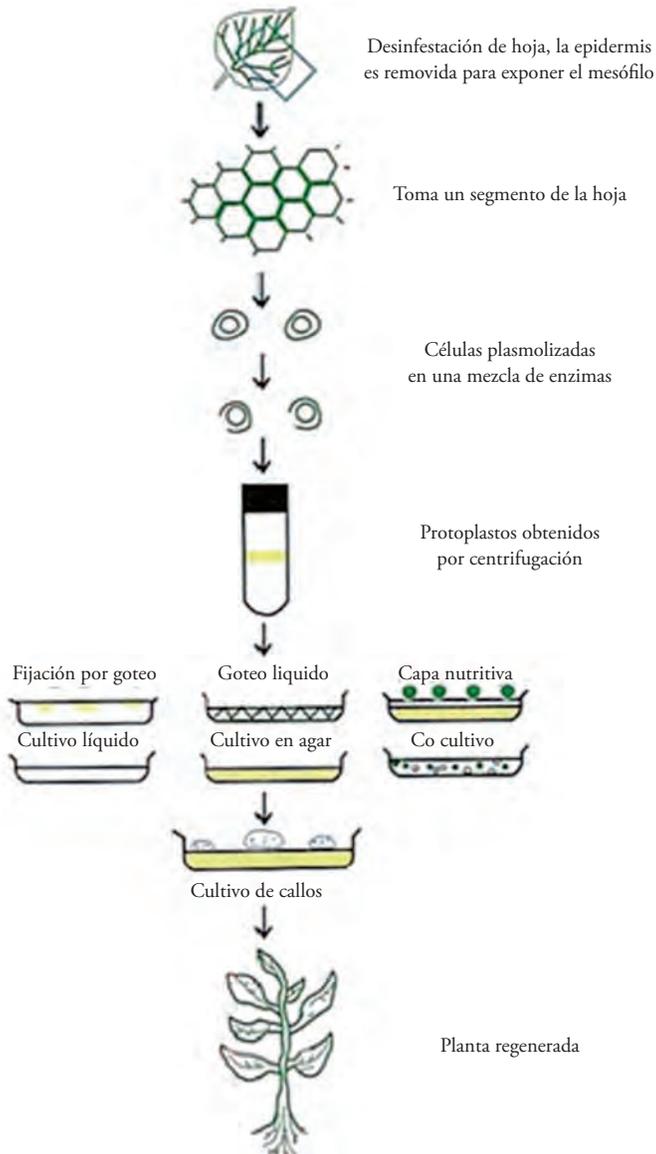
- 4) Aclimatación de las nuevas plantas, fase en la que no se ha encontrado algún tipo de problema, ya que el porcentaje de sobrevivencia ha sido de 70 a 100% (Kumar *et al.*, 2004; Al-Khalifah *et al.*, 2005; Nak-Udom *et al.*, 2009).

CULTIVO Y FUSIÓN DE PROTOPLASTOS

Los protoplastos son células vegetales a las que les ha sido degradada la pared celular con el uso de enzimas específicas. Se obtienen como paso previo para lograr la hibridación somática, mediante la fusión de dos protoplastos con dotaciones cromosómicas iguales o diferentes, lo que permite la introducción de material genético en el núcleo o citoplasma de la célula y que se transmite a la descendencia (Castilla, 2005).

La tecnología de fusión de protoplastos es un método eficiente con el que se puede evitar la incompatibilidad sexual del género y la esterilidad de la F1, y además puede proveer oportunidades para la hibridación de rosa con géneros relacionados (figura 11) (Rout *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2003; Castilla 2005).

Figura 11
Cultivo de protoplastos



Fuente: Esquema modificado de Ma'rufah (2008), disponible en <http://www.siafif.com/kuliah/sukma/semester%208/SKRIPSI%20KAKAK%20TINGKAT/lumUT222/kultur-teknik-fusi-protoplast.pdf>

En el cultivo de protoplastos se desinfecta la hoja, se remueve la epidermis y se expone el mesófilo, se toma un segmento de la hoja y las células son plasmolizadas con una mezcla de enzimas, los protoplastos son recolectados por centrifugación y suspendidos en un medio líquido; posteriormente se pasan a un medio de agar para que puedan ser cocultivados y haya formación de callo para lograr la regeneración de plántulas.

En la rosa, los protoplastos han sido aislados de diferentes fuentes como los callos, suspensión celular y hoja (Krishnamurthy *et al.*, 1979; Pearce y Cocking 1973 y Pati *et al.*, 2001; Marchant *et al.*, 1997, citados por Pati *et al.*, 2004). Se ha logrado la regeneración de plantas a través de protoplastos, en *R. pérsica x xantina* (Mathews *et al.*, 1991, citado por Canli y Kazaz, 2009).

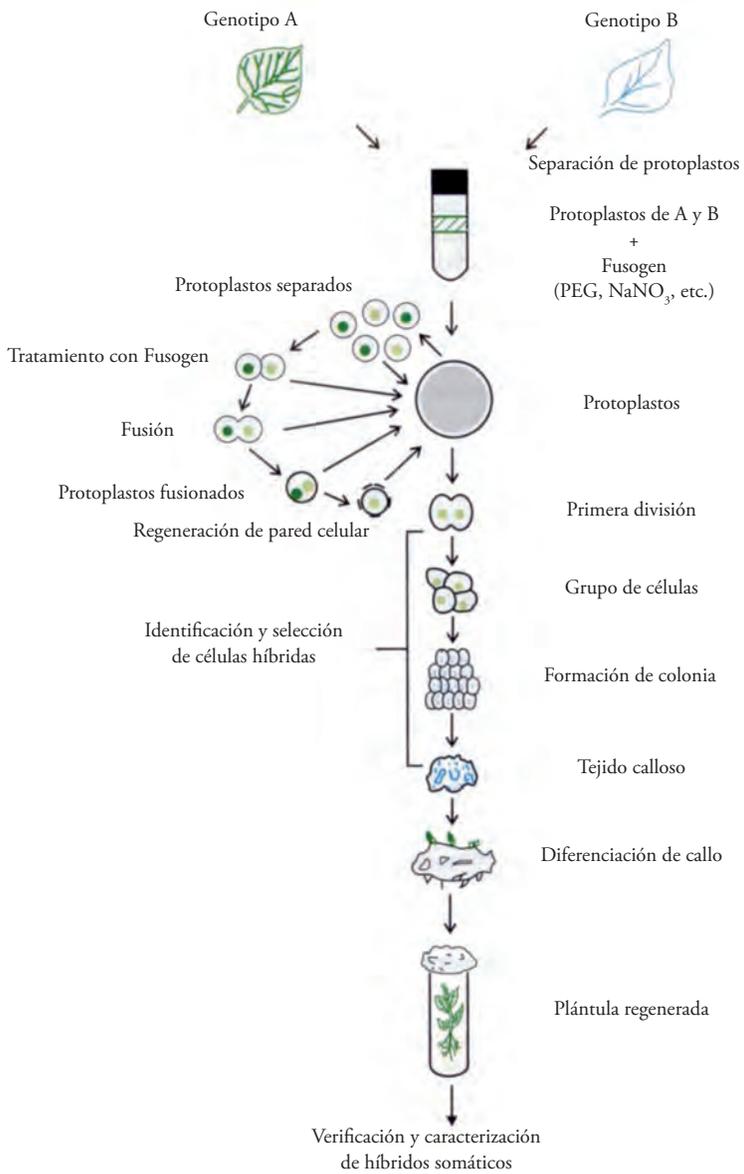
Para que un programa de hibridación somática tenga éxito se requiere de un protocolo eficiente y la regeneración de plantas (Kim *et al.*, 2003). Esta técnica, si bien presenta algunas limitaciones, como una elevada esterilidad o imposibilidad de regenerar plantas, en algunos casos, demostró ser útil en la mejora genética de las plantas como, por ejemplo, cuando se requiere transferir resistencia a enfermedades o tolerancia al estrés (Polci y Friedrich, 2004).

En los protocolos empleados para el aislamiento de protoplastos se usan enzimas fúngicas con actividad celulasa y pectinasa, es necesario, en algunos casos, el agregado de hemicelulasas. Las celulasas y hemicelulasas degradan la pared celular, en tanto que las pectinasas digieren la matriz de pectina.

Uno de los usos potenciales de esta técnica en el mejoramiento de la rosa incluye la transferencia de rasgos controlados por varios genes, dada la incompatibilidad sexual entre los miembros de la familia Rosaceae, lo que permite ampliar la reserva genética disponible para su mejoramiento (Mottley *et al.*, 1996).

También se ha hecho fusión de protoplastos (figura 12) (Mottley *et al.*, 1996) derivados de callos de diversos cultivares de rosas (*Rosa hybrida* “Frensham”). Estos protoplastos fueron fusionados con protoplastos de cereza (*Prunus avium x pseudocerasus* “Colt”) y mora (*Rutus laciniatus* “Thornless Oregon”), con el fin de duplicar el nivel de ploidía de la rosa y hacer una hibridación intergenérica entre miembros de la familia *Rosaceae*. Hubo regeneración de plántulas por hibridación somática entre los diferentes cultivares, los cuales exhibieron una morfología inusual, y se originaron plantas tetraploides que inicialmente eran diploides. Además, los supuestos híbridos intergenéricos fueron variantes del cultivar de rosa, hecho comprobado con un estudio citológico y con marcadores moleculares (RAPD).

Figura 12
Fusión de protoplastos



Fuente: Esquema modificado de Ma'rifah (2008), disponible en <http://www.siafif.com/kuliah/sukma/semester%208/SKRIPSI%20KAKAK%20TINGKAT/lumUT222/kultur-teknik-fusi-protoplast.pdf>

Para la fusión de protoplastos se toma material de dos genotipos diferentes, se aíslan los protoplastos y se colocan sobre una base donde se hace un tratamiento para que se lleve a cabo la fusión que permita una regeneración de la pared celular, favoreciendo una división celular donde se hace una identificación y selección de las células híbridas hasta llegar a la formación de callo, éste se diferencia para una regeneración de plántulas y, por último, se hace una verificación y caracterización de los híbridos somáticos.

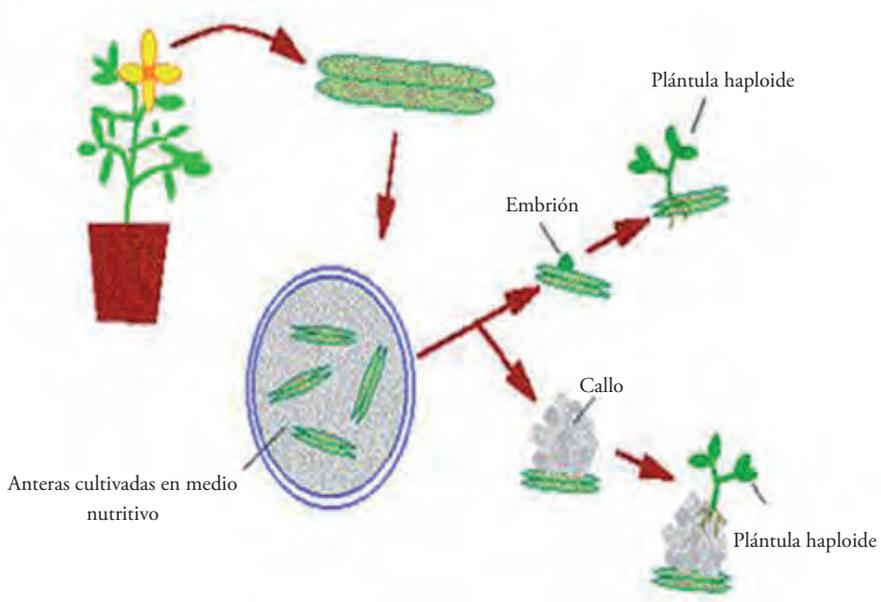
En el protocolo empleado para el aislamiento de protoplastos se usaron raíces derivadas de callos. Los protoplastos fueron suspendidos por 25 minutos en 10 ml L⁻¹ rodamina-6-G (R6G) o 200 ml L⁻¹ iodoacetato (IOA), disuelto en un medio CPW13M de Frearson. Los protoplastos se centrifugaron, fueron lavados y resuspendidos en CPW13M. Los protoplastos de cada especie se pasaron a un solo tubo de centrifugación para ser fusionados, y el pellet (masa sedimentada) fue resuspendido en CPW13M. A la mezcla se le adicionaron 2 ml de medio de fusión PEG (PoliEtilenGlicol), con 30% de PEG 6000, 4% de sacarosa y 0.1% de CaCl₂·H₂O. También agregaron 0.5 ml de manitol a 9% en agua destilada (DW9M), al tubo que contenía los protoplastos, y de esta manera quedaron listos para su cultivo. El medio de cultivo KM8p contenía 3 ml L⁻¹ 2,4-D, pero sin manitol. Todo este procedimiento se llevó a cabo por el método reportado por Matthews *et al.* (1991).

Se han aislado protoplastos de microesporas de polen de *R. damascena*, *R. bourboniana* y cuatro especies silvestres *R. bruonii*, *R. cathayensis*, *R. indica* y *R. multiflora* (Pati *et al.*, 2004); se utilizaron botones florales de diferentes tamaños, y se procuró que estuvieran en etapa de tétrada; con cada botón se aislaron los protoplastos de las tétradas de microesporas, y se logró estandarizar el procedimiento para aislar los protoplastos de microesporas en estado de tétrada en las diferentes especies utilizadas. Los botones florales fueron lavados con Tween-80 y esterilizados en una solución de cloruro de mercurio (0.04%). Las anteras fueron seccionadas y maceradas con una mezcla de enzimas en diferentes concentraciones de Driselasa (0.5-3.0%) preparada con CPW, solución salina, y suplementada con sacarosa en un rango de 15 a 39%. Las tétradas fueron incubadas en la oscuridad a 25 °C junto con la driselasa (2%). La concentración de sacarosa 20-25% fue el tratamiento óptimo para la liberación de los protoplastos.

CULTIVO DE ANTERAS

Consiste en el cultivo de anteras con polen inmaduro (figura 13), el polen se divide para formar embriones o callo. Cuando se transfieren a los medios de regeneración se forman plántulas. Por lo general, el cultivo de anteras se utiliza para la obtención de plantas haploides. Éstas se regeneran a través de la embriogénesis somática a partir del polen, directamente o por vía de organogénesis a partir de un callo. Algunas veces se cultiva el polen, una vez que ha sido aislado de la antera, se le llama cultivo de polen o de microsporas (Abdelnour-Esquivel y Vicent, 1994).

Figura 13
Cultivo de anteras



Fuente: Polci *et al.* (2010), *Métodos para acelerar programas de mejoramiento e identificación varietal*, Consejo Argentino para la Información y Desarrollo de la Biotecnología, Argentina, disponible en http://www.argenbio.org/adc/uploads/libro_INTA_II/Parte_III.pdf

Las anteras se colocan en un medio de cultivo, pasan a fase de embrión o callo, lo que da como resultado una plántula haploide.

El cultivo de anteras es efectivo en la producción de plantas haploides de muchas especies. Tabaezadeh y Khosh-Khui (1981, citados por Rout *et al.*, 1999) reportaron el primer trabajo de inducción de callos por medio del cultivo de anteras de dos especies tetraploides de rosa ($4n = 28$). Sembraron las anteras en diferentes etapas de desarrollo y distintos medios de cultivo, con una variación en la concentración de auxinas y kinetina, bajo diferentes condiciones de luz. El tratamiento 2.0 mg L^{-1} IAA y 0.4 mg L^{-1} Kinetina fue el mejor para *R. damascena* y para *R. hybrida*, el tratamiento óptimo fue de 7.5 mg L^{-1} IAA y 0.8 mg L^{-1} de kinetina.

GERMINACIÓN DE POLEN

La calidad del polen es una de las características más importantes para determinar si es posible utilizar una variedad, como polinizador, en trabajos de mejoramiento genético (hibridación interespecífica). El éxito de las hibridaciones depende, en gran medida, de la capacidad del polen para germinar y de las condiciones ambientales durante la formación, el desarrollo y la maduración del polen, así como de la sanidad del entorno, por lo que se hace necesario desarrollar métodos de evaluación de la fertilidad del polen confiable, de rápida ejecución y económico; por esta razón, es necesario realizar pruebas *in vitro*, pues permiten conocer la viabilidad y germinación del polen de los diferentes genotipos, (aspectos de gran importancia para los trabajos de hibridación) (Fernández-Escobar *et al.*, 1981).

Se ha encontrado que la germinación *in vitro* de polen de rosa está influenciada por el pH del medio; la germinación y la elongación de los tubos polínicos estuvieron en un pH máximo de 5.0 (Gudin y Arene, 1991, citados por Rout *et al.*, 1999). Una opción importante en el cultivo del polen es utilizarlo criopreservado, ya que retiene la habilidad de fertilizar y producir semillas. Esta habilidad fue probada por germinación *in vitro* después de un año de almacenamiento en nitrógeno líquido. Se evaluaron cinco cultivares de rosa (Ferry Porche, Bronze Masterpiece, Queen Elizabeth, John F. Kennedy y Lady X) y el porcentaje de germinación de los granos de polen fue bajo, en un medio que contenía sólo sacarosa. La adición de ácido

bórico en el medio mejoró la germinación de los granos de polen. Se encontró que la mayor tasa de germinación fue en los cultivares Ferry Porche y Lady X, con 15% de sacarosa + 50 ppm de ácido bórico, y 20% de sacarosa + 100 ppm de ácido bórico, respectivamente (Rajasekharan y Ganeshan, 1994, citados por Rout *et al.*, 1999).

RESCATE DE EMBRIONES

El rescate de embriones consiste en aislar éstos de los óvulos fertilizados de una planta y cultivarlos en un medio aséptico que contenga los nutrimentos esenciales que les permitan concluir su desarrollo normal y germinar. Las dificultades de este proceso incrementan aún más cuando el embrión a rescatar está inmaduro, ya que los requerimientos nutrimentales son más específicos en las etapas tempranas del desarrollo del embrión (Picca y Cardone, 2004). No obstante, el éxito del cultivo de embriones dependerá de la composición del medio de cultivo, del estado de desarrollo del embrión y del genotipo (Pérez-Tornero *et al.*, 2007).

Una de las dificultades que se ha encontrado en el mejoramiento genético de la rosa es que ocasionalmente el desarrollo del embrión es obstaculizado por un aborto prematuro, de lo que resultan pocas o ninguna semilla viable, ya que las rosas son altamente heterocigóticas y este comportamiento reduce la eficiencia de los programas de mejoramiento (Lammerts, 1946, citado por Mohapatra y Rout, 2005).

Igualmente, uno de los factores importantes de la falta de germinación es la restricción mecánica del embrión, ya que está cubierto por una capa gruesa de pericarpio y la dormancia es regulada por inhibidores de crecimiento (Ácido abscísico, ABA) dentro del aquenio (Von Abrams y Hand, 1956; Jackson y Blundell, 1963; Semeniuk *et al.*, 1963, citados por Mohapatra y Rout, 2005). Los tratamientos hormonales, escarificación y estratificación han sido utilizados para mejorar la capacidad de germinación. Sin embargo, estos procedimientos son poco efectivos y requieren de bastante tiempo, por lo que el cultivo de embriones puede ser utilizado para acortar el ciclo de la rosa (Arunachalam y Kaicker, 1994, citados por Canli y Kazas, 2009).

Para el rescate de embriones se han utilizado frutos inmaduros colectados 40 días después de la polinización en plantas de rosa cv. Arunima y Shocking Blue. Se cultivaron *in vitro* para verificar cuál era el mejor tratamiento para su buen desarrollo, se encontró que en un MS con 2.5 mgL⁻¹ de BA, 0.5 mgL⁻¹ de AG₃ y 3% de sacarosa, en un fotoperiodo de 16 h, fue el mejor tratamiento. Cabe destacar que la combinación de BA y AG₃ mostró un mejor efecto que el BA solo. También se observó que a grandes concentraciones de BA y AG₃, los embriones se vitrificaron. El porcentaje de germinación fue de 86% para Arunima y 87.3% para *Shocking Blue*, y esto se debió principalmente a que el cultivo se incubó por dos semanas en la oscuridad y después de transfirió a la luz por 16 h, y 94% de la plántulas obtenidas sobrevivieron a las condiciones de invernadero (Mohapatra y Rout, 2005).

CULTIVO DE CALLOS

El callo representa un crecimiento desorganizado de células, obtenido a partir de un determinado tejido. Su formación comienza con el aislamiento de órganos o tejidos que posteriormente desdiferencian ante la presencia de una auxina exógena en el medio de cultivo. Las células proliferan aceleradamente, dando origen a una masa amorfa (Gómez, 1998, citado por Castilla, 2005).

El cultivo de callos en rosa ha sido establecido en muchos laboratorios a través de diferentes tipos de explantes como segmentos de tallo, hoja, peciolos, raíces adventicias, pétalos (Rout *et al.*, 1999). Además, se requieren niveles apropiados de auxinas y citocininas para la iniciación de callo y la proliferación de las especies o variedades utilizadas.

Se ha investigado el desarrollo de callos a partir de explantes de pétalos en siete cultivares de rosa en distintos medios: Contempo, América's Junior Miss, Manasi, Mrinalini, Preyasi, Sylvia y Queen Elizabeth. Los resultados reportados con mayor éxito fueron: MS con 1 mgL⁻¹ de ANA y 1 mgL⁻¹ de BA y el medio Schenk y Hildebrandt (SH) con 2 mgL⁻¹ de 2,4-D y 1 mgL⁻¹ de BA (Datta *et al.*, 2002). De la misma manera, se probaron los RCV BA y ANA en *R. canina* y *R. dumalis*, para la inducción a callo, utilizando segmentos nodales de 0.4 a 0.5 cm, fueron sembrados en un medio MS. Se detectó que en *R. canina* la inducción de

callos era alta a elevadas concentraciones de ANA y BA, mientras que en *R. dumalis* las bajas concentraciones de ANA y altas de BA tuvieron el mismo efecto (Esitken y Ercisli, 2001).

Las especies productoras de aceites esenciales, *R. damascena* cv. Noorjahan y *R. chinensis landrace*, han sido estudiadas por medio de organogénesis, tanto directa como indirecta.

Para el primer caso, se probaron 12 combinaciones de medio, en las cuales el medio basal MS fue suplementado con distintas concentraciones de bencil amino purina (BAP) y ANA para inducir la regeneración de brotes adventicios a partir de explantes nodales de las dos especies. Para lograr la organogénesis indirecta se empleó un medio MS $\frac{1}{2}$ con 0.5 mgL^{-1} de BAP, suplementado con AG_3 y disulfato de adenina (ADS). En ambos experimentos se obtuvo regeneración de brotes a partir de los explantes nodales y de los callos (Ritika *et al.*, 2001). Sin embargo, un punto muy importante que se observó es que el genotipo de la planta y el tipo de explante utilizado son factores que influyen en la inducción y proliferación de callos. Por otra parte, seis cultivares de *R. floribunda*, con tres tipos de explantes, y cultivados en un medio MS con BA, ANA y 2,4-D, para obtener callos, alcanzaron la mayor frecuencia de inducción para el cv. Dacapo, con el uso de las bases de las yemas como explante, no obstante, el mejor crecimiento de callos se observó en el cv. LiliMarlene, empleando pétalos (Kuusiene *et al.*, 2001).

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La embriogénesis somática (ES) es un proceso mediante el cual los embriones se desarrollan a partir de células somáticas, logrando la madurez y posteriormente su germinación para generar plantas (Witjaksono, 1997, citado por Hussein *et al.*, 2006). La embriogénesis somática puede ser iniciada por dos mecanismos: directamente de explantes, donde las plantas son genéticamente idénticas (clonación) e indirectamente de tejidos desorganizados (callos). La propagación por embriogénesis indirecta lleva el riesgo de producir plantas que pueden diferir genéticamente de cada uno y de las plantas progenitoras. Se piensa que la aparición de la variabilidad genética dentro del cultivo de tejidos puede ser, en parte, originada por cambios celulares inducidos durante el cultivo. Esta variabilidad genética está

asociada con el tejido y el medio de cultivo, y es llamada “variación somaclonal”. La inducción de embriones somáticos directamente de un tejido es lo más conveniente para evitar la variación somaclonal (Ahoshima, 2005, citado por Hussein *et al.*, 2006), además, esto reduce el tiempo que se requiere para la regeneración de plantas, lo cual puede ser un beneficio para minimizar la inducción de cambios en el tejido (Fuentes *et al.*, 2000, citado por Hussein *et al.*, 2006). Los explantes utilizados en la embriogénesis somática en rosa han sido: hojas, internodos, raíces, filamentos de estambres o embriones cigóticos (de Wit *et al.*, 1990, Kintzios *et al.*, 1999, Kunitake *et al.*, 1993, Merchatn *et al.*, 1996, Noriega y Söndahl 1991, Roberts *et al.*, 1995, Rout *et al.*, y van der Salm *et al.*, 1996, citados por Dohm *et al.*, 2001); así como en diferentes cultivares de rosa pertenecientes a diferentes grupos, como son los Híbridos de Té, Floribundas, Rosas miniaturas, Arbustivas, Trepadoras, Porta-injertos, además de especies silvestres (Dohm *et al.*, 2001). La ES tiene muchas aplicaciones, ya que una de las ventajas es que se pueden hacer propagaciones en masa, por su alta tasa de multiplicación, la facilidad de utilizar medio líquido y el manejo de grandes números de embriones. Otra de sus ventajas es que proporciona el proceso experimental ideal para investigar la diferenciación y para entender los mecanismos de expresión de la totipotencia en las plantas (Arya *et al.*, 2000, citado por Hussein *et al.*, 2006).

La ES es un proceso multi-pasos para la regeneración: comienza con la formación de masas pre-embriogénicas, continúa con una formación de embrión somático, maduración, germinación y regeneración de planta. Aunque los protocolos de ES en gran parte dependen de las especies vegetales y de los cultivares a utilizar, la producción de embriones somáticos generalmente implica cuatro principales procesos: (1) inducción, (2) mantenimiento del cultivo embriogénico, (3) desarrollo del embrión, y (4) regeneración del embrión (Korban, 2005; Ibaraki y Kurata, 2001, citados por Hussein *et al.*, 2006).

La inducción es el proceso por el que las células del explante (porción de la planta donante cultivada *in vitro*) cambia su patrón de expresión y genera los embriones somáticos iniciales. El medio de cultivo generalmente está condicionado por la presencia de reguladores de crecimiento, fundamentalmente auxinas y citoquininas, pero se puede desencadenar, si el explante es inmaduro, en ausencia de los mismos (Fernández-Guijarro, 1997, citado por Celestino *et al.*, 2005). En esta etapa de inducción muchos autores han utilizado diferentes tipos de explantes,

principalmente: embriones cigóticos inmaduros, brotes laterales, segmentos de tallo con hoja y segmentos de raíz.

El medio de cultivo que se ha utilizado para la inducción es el SH (Schenk y Hildebrandt) (Kim *et al.*, 2009; Kamo *et al.*, 2004), con 600 a 1000 mg L⁻¹ *m*-inositol, 0.5 a 1.0 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 0.1 a 0.5 mg L⁻¹ de piridoxina, 0.1 a 5.0 mg L⁻¹ de tiamina y sacarosa al 3%. De igual manera se puede utilizar el MS (Murashige y Skoog) (Marchant *et al.*, 1996; Dohm *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003b; Kintzios *et al.*, 1999), adicionado con diferentes RCV, 0.004 a 0.3 mg L⁻¹ de NAA, 0.1 a 1.0 mg L⁻¹ de BAP, 0.1 a 0.2 mg L⁻¹ de GA₃, además de sacarosa. El cultivo se incuba a 25 °C en la oscuridad, después de seis semanas los explantes son transferidos a un nuevo medio de inducción de embrión, con la misma composición (Marchant *et al.*, 1996; Kintzios *et al.*, 1999) o sin RCV (Kintzios *et al.*, 1999), o sólo con algún RCV, NAA o 2,4-D (Dohm *et al.*, 2001). En esta segunda fase, el callo embriogénico, formado frecuentemente, es acompañado por un callo no embriogénico, el cual crece más rápido que el callo embriogénico. Estos intervalos de subcultivos tienen un gran impacto en el mantenimiento del callo embriogénico, ya que éste, en algunas especies y genotipos, puede ser subcultivado por un periodo prolongado en un medio que contenga RCV e incluso conservar su potencial embriogénico (von Arnold *et al.*, 2002, citado por Hussein *et al.*, 2006). Sin embargo, la variación somaclonal ha demostrado que se incrementa cuando el cultivo *in vitro* se mantiene por un tiempo prolongado (Lakshmanan y Taji, 2000, citado por Hussein *et al.*, 2006).

Posteriormente se realizan algunos subcultivos, aproximadamente por cuatro a seis semanas cada uno, y el explante se pasa de nuevo a un medio de cultivo, con el objetivo de hacer madurar y mantener el callo embriogénico, donde el medio va adicionado con vitaminas, sacarosa a 3%, 100 mg L⁻¹ de *m*-inositol, 2 mg L⁻¹ de glicina y 0.25% de carbón activado (Kamo *et al.*, 2004), el medio también puede ir adicionado con sales inorgánicas, vitaminas y RCV con 1.0 mg L⁻¹ de 2,4-D, 1.0 mg L⁻¹ de ABA, 0.3 mg L⁻¹ de GA₃, sacarosa a 3%, 0-600 mg L⁻¹ de L-prolina (Marchant *et al.*, 1996). Luego prosigue la fase de conversión del embrión a planta, donde el primero debe estar en la fase cotiledonar, es decir, el embrión ha madurado completamente. Por lo tanto, la finalidad de los RCV es verificar qué tan útiles son para el desarrollo de un embrión somático. Así, el efecto del ABA ha sido reportado con 36% de efectividad en la proliferación y germinación de embriones

somáticos y el crecimiento de callos embriogénicos, por su parte se ha reportado que el Tidiázurón (TDZ) es mucho más efectivo que BA para la inducción de callos embriogénicos, pero menos efectivo que BA para la inducción de embriones secundarios y germinación de embriones somáticos (Li *et al.*, 2002). Por otro lado, ha sido demostrado que el ABA controla la germinación precoz, lo que permite una formación normal y madurez del embrión somático. También las concentraciones diferentes de 2,4-D y de BA mostraron que, en el control directo de embriogénesis, dio un mejor resultado BA, sólo en una frecuencia de 27.3%, y se produjeron de tres a seis embriones somáticos; de forma indirecta hubo una frecuencia de 25% de embriones formados con una combinación de 2,4-D y BA (Suk *et al.*, 2003). En contraste, con la concentración del 2,4-D en la fase de proliferación, el medio tuvo claramente un efecto marcado sobre la embriogénesis somática, ya que la embriogénesis se redujo al incorporar 1.0 mg L⁻¹ del 2,4-D, sin embargo, aumentó al incrementar la cantidad de 2,4-D a 3.0 mg L⁻¹ (Marchant *et al.*, 1996)

VARIACIÓN SOMACLONAL

La variación somaclonal (vs) se refiere a la variación genética *in vitro*, en cultivos celulares, de tejidos y órganos, así como de plantas regeneradas de los mismos. La vs generalmente es espontánea y los cambios pueden ser heredables o no. Cuando la variación somaclonal es heredable, se le asocia con arreglos cromosomales, deleciones y mutaciones. Por otro lado, cuando la vs es epigenética, puede ser resultado de un cambio en la expresión de los genes, reversible y no heredable, asociado con alteraciones en los patrones de metilación del DNA (Larking y Scowcroft, 1981; Sahijram *et al.*, 2003; Anu *et al.*, 2004, citados por Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009).

La vs puede ser utilizada como herramienta para inducir variabilidad genética y, en el mejor de los casos, obtener características agronómicas deseables (Araújo *et al.*, 2001; Jain 2001, citados por Sánchez-Chiang y Jiménez 2009). Sin embargo, las variantes somaclonales han sido utilizadas comercialmente por sus características de resistencia a enfermedades, mejora en la apariencia en la planta, flores y frutos, tamaño, sabor, fragancia y presencia de metabolitos de interés (Sánchez-Chiang y Jiménez 2009; Cardone *et al.*, 2004).

La aparición de la VS depende de varios factores externos, como son: (1) método de cultivo *in vitro* y el patrón de desarrollo; (2) la edad del cultivo y subcultivos, y (3) algunos componentes del medio, además de la tasa normal de variación, propia de las células vegetales en condiciones normales, que forma parte de un tejido, en un órgano y plantas intactos.

- Método de cultivo *in vitro* y el patrón de desarrollo: el estado físico del medio de cultivo también influye en el nivel de variación obtenida. El explante puede tener un comportamiento diferente si se cultiva en un medio sólido o en un medio líquido (Cardone *et al.*, 2004). No obstante, el patrón de desarrollo que sigue un explante durante la morfogénesis *in vitro* es un elemento clave que se relaciona con la vs, sobre todo cuando el cultivo es a partir de yemas, organogénesis y embriogénesis somática (George 1993, citado por Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009).
- Edad del cultivo y subcultivos: es otro factor que afecta la variación, ya que aumenta la proporción de variación en cultivos envejecidos y en plantas con varios subcultivos. La vs puede aparecer después de tres a ocho subcultivos; una observación común es que en los periodos prolongados de cultivo hay una pérdida de totipotencia debido a la acumulación de mutaciones y a la alteración de genes responsables de la regeneración (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009; Cardone *et al.*, 2004).
- Componentes del medio de cultivo: se ha encontrado que los RCV, principalmente aquellos con naturaleza auxínica, pueden promover la metilación del DNA. El 2,4-D ha sido señalado como inductor de inestabilidad, por ello se especula acerca de su rol indirecto en la inducción de cambios en el metabolismo celular y tisular de las plantas. El 2,4-D induce desdiferenciación, que sería el generador de los cambios, también se ha observado que las deficiencias o excesos de azufre, fósforo, nitrógeno, calcio y magnesio pueden resultar en cambios genómicos (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009; Cardone *et al.*, 2004).

Asano y Tanimoto (2002) evaluaron el cv. Shortcake de rosa miniatura, utilizando semillas inmaduras como explante, y colocaron en un medio MS para la inducción de callo embriogénico sin RCV. Posteriormente hicieron varios subcultivos con el fin de evaluar el efecto de BA en un rango de 0 a 2 mg L⁻¹, donde la concentración óptima fue de 1 mg L⁻¹ y el medio de enraizamiento con AIB a 0.25 mg L⁻¹, los

cuales desarrollaron 80% de brotes con raíces; 70% de las plantas trasplantadas se aclimataron y crecieron exitosamente. Sin embargo, se observaron algunas variaciones morfológicas en las plantas regeneradas, como tamaño de la flor; número de pétalos, que fue menor de 18 en comparación con la planta original; color de los pétalos, en la superficie adaxial de la planta original fue rojo y en la parte abaxial, blanca. No obstante, el color de los pétalos de la superficie abaxial en las plantas regeneradas disminuyó y el de la flor fue rojo rosáceo brillante, los pétalos fueron más largos que la original, la forma de las hojas fueron redondas y las espinas más delgadas que las de la planta original. Todas las diferencias mostradas se analizaron con RAPD y el resultado sugirió que las variaciones polimórficas fueron causadas por una diferencia de genes, por lo que se concluyó que el medio utilizado indujo variación somaclonal.

CAPÍTULO 4

BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

MARCADORES MOLECULARES, UNA HERRAMIENTA DE APOYO PARA EL FITOMEJORAMIENTO

Gracias a los avances de la biología molecular, se han desarrollado métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares que superan, en la mayoría de los casos, las limitaciones de los métodos tradicionales, como en el uso de marcadores morfológicos, ya que tiene muchas limitantes, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos, y su evaluación sólo es posible a nivel de la planta y cuando ésta llega a su estado adulto (Azofeifa-Delgado, 2006).

Los marcadores moleculares corresponden a cualquier gen cuya expresión permite un efecto cuantificable u observable (características fenotípicas), que además pueden detectarse fácilmente. Este tipo de marcadores pueden evaluarse desde que los individuos están en sus primeros estadios de desarrollo, usando a todo el individuo o sólo una parte de él (Solís y Andrade, 2005). Los marcadores idóneos son los de DNA, es válido cualquier fragmento que se encuentre muy cerca del gen o de la secuencia de interés, y que lógicamente no afecte al carácter en estudio. Los marcadores de DNA se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias de pequeñas secuencias del DNA entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los diversos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Azofeifa-Delgado, 2006).

Dentro de este grupo de marcadores se incluyen tres categorías básicas: 1. Métodos que no se basan en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), como los RFLP (Random Fragment Length Polymorphism), considerados marcadores de alta eficacia; permiten el análisis de un elevado número de loci por experimento, sin requerir información previa sobre su secuencia, son, en su mayoría, dominantes y altamente reproducibles (Azofeifa, 2006). Las principales aplicaciones de los

RFLP son la caracterización de germoplasma, estudios filogenéticos, pureza de semillas híbridas, selección y/o localización de genes específicos (mediante análisis de ligamiento) con características agronómicas importantes, etc., (Valadez y Kahl 2000, citados por Azofeifa, 2006).

También en esta categoría están los VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) o también llamados “minisatélites y las huellas genéticas de DNA” (*fingerprinting*), ya que el término de minisatélites designa a loci que presentan un número variable de secuencias en tándem. El número de repeticiones en estos loci es muy variable, son especialmente polimórficos. Esta propiedad los convierte en herramientas útiles para la identificación de individuos y para el análisis de las relaciones de parentesco (Jordano, s/a).

La segunda categoría son los marcadores en la amplificación de DNA por PCR, donde la PCR está basada en la síntesis de millones de copias de un fragmento de DNA comprendido entre secuencias complementarias a dos oligonucleótidos llamados *primers* (también conocidos como iniciadores o cebadores). Dentro de este tipo de marcadores se encuentran los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA por sus siglas en inglés) (Valadez y Kahl, 2000, citados por Azofeifa, 2006), que han sido utilizados para la identificación de híbridos interespecíficos, como es el caso de *R. dumalis* y *R. rubiginosa* (Werlemark, 2000, citado por Kaul *et al.*, 2009). Los AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) presentan un alto poder de detección de variabilidad genética debido a que exploran simultáneamente la presencia o ausencia de sitios de restricción. Este marcador dominante es una herramienta mucho más poderosa que los RAPD, porque permite amplificar secuencias más largas de oligonucleótidos (lo que incrementa significativamente la especificidad), no requiere información previa de la secuencia de DNA (Picca *et al.*, 2004a). Los AFLP fueron los primeros marcadores probados en un pequeño número de estudios, para la detección de parentesco entre especies de rosa (Wim *et al.*, 2008). Los AFLP también se utilizan para estudiar la similaridad genética entre los supuestos progenitores, en el caso de plantas apomícticas (Crespel *et al.*, 2001), donde los AFLP confirmaron el origen apomíctico en la progenie de *R. gigantea* y *R. wichuriana*. De la misma manera, se ha estudiado la relación evolutiva del género *Rosa*, por medio de un análisis filogenético entre los subgéneros y las secciones, y a través de estos marcadores pudieron reconstruir la relación evolutiva de este complejo grupo (Koopman *et al.*, 2008).

Los ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) (Zietkiewicz *et al.*, 1994, citado por Escandón *et al.*, 2005) son marcadores compuestos de una secuencia corta repetida, no requieren información previa sobre las series del genoma a estudiar, son polimórficos y altamente reproducibles por el uso de altas temperaturas de alineación, son sensibles a encontrar variación genética entre individuos muy cercanos (variedades agrícolas). Además, son relativamente fáciles, rápidos de realizar y de bajo costo. Referente al uso de los microsátélites (SSR), se han utilizado principalmente para la identificación de cultivares y sus relaciones genéticas en diferentes especies: *R. canina*, *R. indica*, *R. chinensis*, *R. rubiginosa*, *R. rubrifolia*, *R. hybrida*, se demuestra que este tipo de marcadores son más eficientes y rápidos, ya que son de herencia codominante, detectan un gran número de alelos, en comparación con los RAPD, que no son lo suficientemente informativos, ya que generan un menor número de polimorfismos, y los AFLP, que son más costosos (Crespel *et al.*, 2009; Nybom *et al.*, 2004; Kaul *et al.*, 2009; Esselink *et al.*, 2003).

El uso que se le ha dado a los marcadores moleculares es principalmente para investigar la relación genética entre los géneros y secciones de rosa, así como la identificación varietal entre híbridos interespecíficos de líneas parentales y la diversidad genética. Estos análisis moleculares reducen la ambigüedad de los estudios de tipo morfológico, por lo que los marcadores moleculares han sido de gran ayuda para saber de dónde se han obtenido los materiales actualmente utilizados. Se han identificado híbridos interespecíficos, como es el caso de *R. dumalis* y *R. rubiginosa* (Werlemark, 2000, citado por Kaul *et al.*, 2009). Además, se han identificado y seleccionado variedades de rosa de la sección *Caninae* de acuerdo con su zona de origen (Atienza *et al.*, 2005), por medio de marcadores RAPD, donde concluyeron que la diversidad genética, en general, de la sección *Caninae* depende de la especie y de la distancia geográfica observada hasta cierta medida.

IDENTIFICACIÓN DE GENES DE IMPORTANCIA AGRONÓMICA

Los análisis genéticos en las rosas son escasos en comparación con los principales cultivos de alimentos o frutas (tomando en cuenta su importancia en la industria florícola), esto se debe a que los análisis en variedades tetraploides son más

complicados que los de variedades diploides, además de que las poblaciones diploides segregan un mayor número de caracteres agrónomicamente importantes en comparación con las poblaciones tetraploides (Debener, 1999, citado por Debener y Linde, 2009).

La caracterización de genes por medio de marcadores moleculares clásicos, conjuntamente con la estimación de la diversidad genética, pueden ser utilizados para establecer los marcadores que corresponden con rasgos fenotípicos de interés y utilizarlos para la selección asistida, la construcción de mapas genéticos y locus de carácter cuantitativo (QTL, *Quantitative Trait Loci*, por sus siglas en inglés) (Casanova *et al.*, 2005). En *Rosa* spp., por ejemplo, se ha creado un mapa genético de alta densidad para la detección de genes de interés agrónomico. Los mapas de ligamiento fueron construidos con marcadores moleculares (incluyendo AFLP, ISSR, RFLP, RAPD, entre otros) y marcadores morfológicos. El resultado fue un mapa de gran cobertura y con marcadores robustos, con lo cual se abrió una muy promisoría perspectiva para la confección de mapas de QTL y para el mejoramiento asistido por marcadores (Escandón *et al.*, 2003). Con el desarrollo del mapa de ligamiento se pudieron identificar, funcionalmente, diversas regiones del genoma, por ejemplo:

- Resistencia a enfermedades. Los altos costos de producción, el indiscriminado uso de agroquímicos en plantaciones comerciales y las preocupaciones ambientales han ocasionado un gran interés por mejorar significativamente la resistencia de cultivares de rosa a enfermedades de importancia económica, es el caso de enfermedades como la mancha negra del rosal (*Diplocarpon rosae*), la cenicilla (*Sphaerotheca pannosa*) y el mildiu (*Peronospora sparsa*), investigaciones que se describen a continuación. En rosa se ha detallado muy poco sobre genes de resistencia a enfermedades fungosas; tres de ellos se han caracterizado en poblaciones tetraploides y diploides, sin embargo, el alelo *Rdr1* ha sido el más estudiado. En 1998, Von Maleck y Debener (citados por Whitaker *et al.*, 2007) describieron, con la ayuda de marcadores moleculares SSR (Secuencias Simples Repetidas), al alelo *Rdr1*, gen de resistencia a la mancha negra del rosal (*Diplocarpon rosae*), gen de herencia dominante y de una raza específica, el cual fue encontrado en *Rosa multiflora*, seleccionado y duplicado con colchicina e hibridado en Rosas de Té tetraploides. La secuenciación del alelo *Rdr1* (con un tamaño de 300 kb) reveló un grupo de nueve genes muy similares, los TIR-

NBS-LRR, cinco de los cuales se expresan en los pétalos de rosa a menos de 200 kb. A partir de estos estudios se desarrollaron tres marcadores SSR útiles como marcadores de anclaje para la ubicación de los genes de resistencia a la mancha negra (Kaufmann *et al.*, 2003).

De igual manera, en 2003, Linde y Debener (citados por Uggla y Carlson-Nilsson, 2005) aislaron e identificaron ocho razas de *Sphaerotheca pannosa* y describieron un gen de resistencia (*Rpp*), que fue mapeado en una población diploide de híbridos de *R. multiflora* con marcadores SCAR (Regiones Amplificadas Caracterizadas y Secuenciadas).

Asimismo, se ha reportado un gen de resistencia dominante (*el Rpp1*) para el mildiu (*Peronospora sparsa*) basado en repetidas inoculaciones con los conidios de la enfermedad en hojas de rosa, dicho loci fue mapeado en poblaciones diploides de híbridos de *R. multiflora*, con ayuda de un marcador SCAR (Linde *et al.* 2004). Además, se han identificado algunos loci (*Rpm*, *CRPM1*) en análisis de plantas infectadas de forma natural en campo y por infecciones artificiales en invernadero; el loci *Rpm* fue mapeado en *R. multiflora* con un marcador AFLP (Zhang, 2003), mientras que el gen *CRPM1* fue identificado en una población de *R. roxburghii* (Xu *et al.*, 2005). Igualmente Li *et al.* (2003) describieron al alelo *AMP1*, un gen que codifica para una proteína antimicrobiana para esta enfermedad.

- Fragancia. El perfume de las flores es uno de los parámetros de gran valor agregado en el mercado de ornamentales; actualmente se conocen cerca de 700 productos volátiles involucrados con el aroma de las plantas, desde el punto de vista químico, son ácidos grasos derivados del benceno, fenilpropanoles y terpenoides. En este tenor, el avance de la genómica ha permitido crear librerías de DNA de pétalos de *Rosa* spp. para desarrollar etiquetas de secuencias expresadas (EST) y microarreglos que, combinados con los resultados de proteómica, han permitido identificar varios genes y estimar sus posibles funciones, entre ellos algunos incluidos en la producción de fragancias (Casanova *et al.*, 2005; Pichersky y Dudareva, 2007).

A este respecto, Channeliere *et al.* (2002) analizaron 1 794 EST de los pétalos de *R. chinensis* cultivar Old Bush y lograron agrupar 877 unigenes. En un estudio similar, Guterman *et al.* (2002) secuenciaron y analizaron 3 500 EST en pétalos de dos cultivares (Fragante cloud y el Golden Gate), agruparon 2 139

unigenes; un gran número de estas secuencias (aproximadamente 15%) eran únicas putativamente relacionadas con el metabolismo del aroma. De ambos proyectos surgieron estudios relacionados para identificar genes responsables del olor de las rosas y se inició, como resultado, la caracterización de un pequeño número de genes implicados en biosíntesis de volátiles aromáticos. Igualmente se han aislado diferentes alcohol acetiltransferasas (AAT), entre ellas las O-metil transferasas (OMT), que son las responsables (principalmente las *Rh OOMT1* y *Rh OOMT2*) de la biosíntesis de los ésteres metílicos fenólicos durante el desarrollo de los compuestos volátiles del aroma de los pétalos de las rosas, función confirmada por experimentos con células libres de extractos de pétalos (Channeliere *et al.*, 2002; Scalliet *et al.*, 2002); también se han aislado diferentes floroglucinol O-metil transferasas (POMT) (Wu *et al.*, 2003) esenciales para la síntesis de TMB (1,3,5-trimetoxi benceno).

- Color de la flor. Un gen (no descrito) ha sido caracterizado y localizado (Tanaka *et al.*, 2008), y está relacionado con la pigmentación de color rosa de los pétalos de las especies de *Rosa* spp. La empresa Suntory Research (Japón) identificó en *Petunia* spp. al gen responsable del color azul; dicha empresa desarrolló estudios para concretar la obtención por ingeniería genética de una rosa de color azul. Las antocianinas son la clase de pigmentos mayoritarios en las flores, son moléculas relativamente simples, solubles en agua, que se encuentran en grandes vacuolas de las células epidérmicas de los pétalos. Un punto clave de la ruta de biosíntesis de estos compuestos es el intermediario DHK (dihidrokaempferol). Las enzimas FLS (flavonol sintasa), F3'H (flavonoide 3'-hidroxilasa), F3'5'H (flavonoide- 3', 5-' hidroxilasa) y DFR (dihidroflavonol reductasa) utilizan este sustrato, y sugieren que este punto es crítico en la biosíntesis de antocianinas y en la determinación del color floral. Para la obtención de rosas azules se incorporaron los genes de la vía de la delfinidina, pigmento responsable del color azul. Además, fue necesario, a través de la tecnología de RNA de interferencia, bloquear la ruta de síntesis de cianidina, para disminuir la concentración de este pigmento y evitar la contaminación del color en los pétalos. Los cultivos de las nuevas variedades azules habrían alcanzado la etapa de ensayos a campo, sin embargo, los resultados que obtuvieron no fueron los esperados. A pesar de obtener líneas transgénicas estables para dichas enzimas, las rosas no presentaban coloración azul debido a la influencia del pH vacuolar en la coloración de los pigmentos (Escandón *et al.*, 2003).

- Morfología de la planta y de la flor. Desde el punto de vista estético, la modificación de la arquitectura de las plantas es uno de los parámetros más codiciados en el mejoramiento de plantas ornamentales, tanto para flores de corte como plantas de maceta, y tiene relevancia a la hora de obtener un cultivo homogéneo en altura, o bien, al incrementar la cantidad de brotes laterales. Una planta con forma diferente implica un gran impacto en el mercado. A pesar de que se conoce un número importante de genes involucrados en la determinación de la arquitectura de las plantas, sólo pocos han sido utilizados en cultivos florícolas. La caracterización funcional de genes implicados en la morfología de la rosa ha sido restringida, hasta el momento, a los genes del complejo MADS con homología a *Arabidopsis thaliana* transformado por *Agrobacteriva tumefaciens*; se ha observado que estos genes alteran el metabolismo de las citocininas, lo que provoca la aparición de fenotipos con mayor cantidad de ramificaciones secundarias (Weigel y Meyerowitz, 1994). También en *R. rugosa* y *Rosa hybrida* cv. Montrea se han aislado genes homólogos de la C-type AGAMOUS, en *R. rugosa* el *Masako C1* y el *Masako D1* se expresan en el tamaño de los estambres y de los carpelos (Kitahara y Matsumoto, 2000, citados por Debener y Linde, 2009).

La inserción de genes de *Arabidopsis* y *Torrenia* en plantas de *Rosa* spp. y su sobreexpresión bajo el promotor 35S ha ocasionado plantas transformantes con mayor cantidad de flores y retraso de la senescencia, con una marcada disminución de sensibilidad al etileno (Kitahara *et al.*, 2004, citados por Deneber y Linde, 2009).

- Vida en poscosecha. El periodo de vida poscosecha de las flores depende del grado de nutrición, la carga microbiana y, fundamentalmente, de la producción de etileno (hormona asociada al proceso de senescencia). Existen sustancias, como las sales de plata, que retardan el proceso (actúan bloqueando el receptor de etileno, *ETR1*), sin embargo, son muy tóxicas y su uso debería dejarse de lado. La señalización de etileno está implicada en un gran número de procesos fisiológicos, como la germinación, el crecimiento, el desarrollo y la abscisión de los órganos vegetativos y la senescencia de flores; no obstante, el desarrollo y la senescencia de flores han sido los más estudiados (Ma *et al.*, 2005); en este sentido, se han identificado genes implicados en la biosíntesis de etileno, incluyendo una ACC oxidasa (*RhACO1*)

y tres sintasas del ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato). Además, se han determinado los genes implicados en la percepción y señalización de etileno, como *CTR1* y el *CTR2*, *EIN3* y *ETR1-3*, dichos genes han sido aislados por métodos basados en homología y han mostrado la regulación del etileno en diferentes etapas de desarrollo de la planta (Muller *et al.*, 2000; Muller y Stummann, 2003; Wang *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2006; citados por Debener y Linde, 2009).

De igual forma, se ha identificado un gen de la proteasa cisteína, el *RbCPI*, que codifica una proteína putativa a 357 aminoácidos y se expresa en la zona de abscisión (AZ) de los pétalos de la rosa. El gen fue sensible al etileno en los pétalos y en las zonas de abscisión los órganos vegetales. La expresión del *RbCPI* es acompañada por la aparición de una cisteín proteasa (37 kDa), que desempeñan un papel importante en varios procesos de desarrollo en las plantas, especialmente las relacionadas con senescencia y muerte celular (Siddhart *et al.*, 2009).

La senescencia de flores se ha estudiado en *R. hybrida* cv. Vainilla y *R. hybrida* cv. Bronze, dichas variedades de rosas poseen diferente periodo para vida en florero. El estudio demostró que *R. hybrida* cv. Vainilla presenta menor sensibilidad al etileno, en este trabajo se comprobó una mayor presencia del gen *RhACS* en este cultivar, por lo cual se le podría atribuir una responsabilidad en la regulación de etileno (Muller *et al.*, 2000a, 2000b).

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

El fitomejoramiento convencional, que entre otros métodos utiliza la hibridación, es lento y se limita a un número reducido de genomas y a la restricción de las barreras naturales del cruzamiento entre especies (Hodson, 2005), como es el caso de la rosa, en la que el mejoramiento genético a través de la forma convencional es limitado por varios factores, tales como la poliploidía y la alta heterocigocidad natural existente entre los cultivares (Kim *et al.*, 2004). Sin embargo, el reciente desarrollo de los métodos no sexuales para transferir genes, como la transformación genética, permite superar esta limitación, con la apertura de nuevas perspectivas en el mejoramiento de las plantas (Díaz *et al.*, 2004).

Los avances en la biotecnología vegetal han permitido superar estas barreras y hacen posible transferir genes específicos provenientes no sólo de otras especies vegetales, muy alejadas desde el punto de vista evolutivo, sino de hongos, virus, bacterias y animales. Conviene destacar que la transformación de plantas es una tecnología que aporta variabilidad genética conocida, sin alterar el fondo genético. Este último aspecto es de gran importancia, ya que la creación de nuevos cultivares es un proceso acumulativo, al que desean incorporar características favorables sin perder las mejoras logradas anteriormente (Díaz *et al.*, 2004). En el caso de la rosa, una característica de la demanda pública, con la cual el mejorador busca satisfacer a los consumidores, es el requerimiento de diversidad, donde principalmente los objetivos para los programas de transformación genética incluyen la reducción del uso de agroquímicos durante el desarrollo y poscosecha a través de genes que confieren un aumento en la resistencia a hongos, bacterias e insectos; y, sobre todo, la inserción de genes que modifican las características florales, tales como el color (Walker, 1996). En contraste, las variantes morfológicas (por variación somaclonal) incluyen enanismo, hojas enrolladas, incremento de ramificación, reducción de diámetro de la flor, modificación de la forma o la reducción considerable en el número de pétalos (Gudin, 2000).

Los requerimientos básicos en trabajos de transformación genética vegetal son:

1. Un sistema de cultivo de tejidos que permita generar plantas completas y fértiles.
2. Vectores apropiados que permitan el clonado del gen de interés y/o su transferencia al tejido blanco de transformación.
3. Un protocolo de transformación (sistema de transferencia de genes y de selección del material transformado).
4. Herramientas de análisis para detectar la presencia del transgen y los productos del mismo en la planta.

La ingeniería genética puede ser usada para introducir rasgos específicos en las plantas, esto no reemplaza al mejoramiento genético tradicional, pero pueden mejorar la eficiencia en el mejoramiento de los cultivos. La transformación genética consiste en introducir un fragmento de DNA exógeno a las células vegetales, que le confiere nuevas características. Los métodos de transformación de plantas pueden ser directos (electroporación, microinyección, polietilenglicol [PEG], biobalística) o indirectos, utilizando *Agrobacterium*, aunque en la actualidad los más usados son la biobalística y la transformación mediada por *Agrobacterium*.

- La biobalística (método directo). Es un método de transformación genética con el cual se introduce DNA en las células mediante la aceleración de partículas o microproyectiles recubiertos con él. Los microproyectiles están hechos de un material inerte como oro o tungsteno (0.5 a 3 μm de diámetro), y mediante una “pistola” son impulsados, haciendo uso de una descarga eléctrica o de gases (CO_2 o helio) comprimidos, hasta impactarse en el material vegetal atravesando la pared celular y las membranas celulares y nucleares (Sanford, 1990, citado por Lagunes, 2009).

Se han regenerado plantas transgénicas a partir de transformación por biobalística (Marchant *et al.*, 1998) en callos embriogénicos de *R. hybrida* cv. Glad Tidings. Antes del cultivo, la selección del medio que contenía 250 mgL^{-1} de sulfato de kanamicin, los callos embriogénicos fueron bombardeados usando un parámetro de distribución del gen noemycin fosfotransferasa (*npt* II). Los embriones somáticos derivados fueron resistentes a kanamicin y esto fue verificado con una prueba NPT II ELISA y un análisis Southern. Todas las plantas regeneradas aparentemente fueron morfológicamente normales.

- La transformación genética mediante *Agrobacterium* (método indirecto). Se utilizan *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* o *A. vitis*, los cuales son patógenos de plantas y tienen la capacidad de integrar establemente parte de su material genético dentro del genoma de su hospedero, pues poseen la capacidad de transferir DNA a las células vegetales. El modelo general de transformación de células vegetales mediante *Agrobacterium* se basa en: a) el reconocimiento físico y la interacción entre la bacteria y la célula vegetal, y la activación de la expresión de los genes de virulencia; b) la producción de sustratos de transferencia y la maquinaria de transferencia; c) la transferencia de sustratos de la bacteria a la célula hospedera; d) el movimiento del T-DNA hacia el núcleo; e) la integración del T-DNA al genoma del hospedero, y f) la expresión de los genes transferidos (McCullen y Binns, 2006, citados por Lagunes, 2009).

Las plantas regeneradas deben ser analizadas por métodos moleculares para identificar aquellas que aporten y expresen los transgenes en los niveles deseados. Para ello se emplean técnicas tales como:

- Hibridación *Southern* o *Southern blot*. Es una de las herramientas moleculares más poderosas para caracterizar las plantas transgénicas. Además de indicar

la presencia o no de la secuencia de interés, provee información acerca de la integración de la misma en el genoma de la célula del huésped (número de copias integradas y número de loci en los cuales se produjo la integración).

- Análisis de RNA con las técnicas de RT-PCR (Transcripción reversa seguida de PCR). Con la hibridación de RNA o *Northern blot* pueden resultar valiosas herramientas para detectar los transcritos de interés presentes en la muestra. La RT-PCR tiene algunas ventajas frente al *Northern blot*: se requiere poca cantidad de material, posee una alta sensibilidad y la muestra es de fácil preparación.
- *Western blot* y Elisa. Aquellas plantas que poseen la secuencia de interés y la expresan como transcrito, pueden ser analizadas con estas técnicas inmunológicas a fin de determinar la presencia de la proteína codificada por el transgen. La actividad de la proteína debe ser medida, ya sea por ensayos bioquímicos o por bioensayos, a fin de interpretar correctamente el fenotipo de la planta obtenida (Díaz *et al.*, 2004).

El primer reporte publicado de transformación genética en *Rosa* fue por Van der Mark *et al.* (1990), quienes transformaron varios clones de *R. canina* utilizando *A. rhizogenesis* como vector *in vivo*, y subsecuentemente fue confirmado por Walker (1996, citado por Gudin, 1999). Firoozabady *et al.* (1994, citado por Kim *et al.*, 2004) y Marchant *et al.* (1998) reportaron un trabajo exitoso en transformación de *R. hybrida* cv. Royalty, por medio de un co cultivo de callos embriogénicos friables con *Agrobacterium tumefaciens* (cepa LBA 4404). Sin embargo, se hace hincapié en que este proceso de transformación depende fuertemente del cultivar, y pasa por una larga fase de callo, con lo que se incrementa el riesgo de variación somaclonal en las plantas regeneradas. Ellos introdujeron a la rosa el gen de la chalcona sintasa, que redujo la intensidad del color del cultivar original.

Dohm *et al.* (2001) utilizaron dos rosales de jardín cv. Heckenzauber y Pariser charme, los cuales eran susceptibles a la mancha negra del rosal (*Diplocarpon rosae*). Emplearon como explante callos embriogénicos y se estableció el primer protocolo de transformación mediado por *Agrobacterium* con genes de transferencia y la regeneración de plantas vía embriogénesis somática. La frecuencia de transformación que se presentó fue arriba de 3% y, de acuerdo con este protocolo, hubo diferentes expresiones de la resistencia codificada por los genes a la quitina. En 80% de las

plantas transgénicas pudo detectarse la expresión de los genes por medio de un análisis Northern. Además, se redujo la susceptibilidad de la mancha negra del rosal en 60%, comparada con las plantas control. Sin embargo, las plantas obtenidas mostraron una variación en la morfología de la hoja y la flor, que puede ser el resultado de la variación somaclonal y del procedimiento de transformación.

Kim *et al.* (2004) trabajaron con *A. tumefaciens* en *R. hybrida* cv. Tineke, usando el gen de proteína verde fluorescente (GFP). Utilizaron la cepa LBA 4404, con el vector binario pBIN m-gfp-ER codificado por el gen GFP, y el gen *nptII* (neomicin fosfotransferasa), para kanamicina, y con el gen *virE/virG* insertados en *A. tumefaciens*. Los resultados mostraron que la adición de los genes *virE/virG* aumentaron el número de callos resistentes a kanamicina, también expusieron el gen GFP, y esto fue confirmado con un análisis de *Southern blot*. Aparentemente las plantas transgénicas se mostraron fenotípicamente normales.

GLOSARIO

Alelo	Una de las formas alternas de un gen que puede existir en un locus.
Alelo dominante	Alelo que expresa su efecto fenotípico, aun cuando esté en heterocigosis con un alelo recesivo, es decir, si A es dominante sobre a, entonces AA y Aa tienen el mismo fenotipo.
Alelo recesivo	Alelo cuyo efecto fenotípico no se expresa en condición heterocigótica, porque es ocultado por el alelo dominante.
Apomixis	Es la producción de un embrión sin meiosis. Las plantas superiores apomíticas producen semillas asexuadas, que provienen de tejido materno solamente.
Árbol genealógico	Diagrama simplificado del linaje de una familia que muestra las relaciones entre los miembros de la familia y cómo se han heredado un carácter específico o enfermedades.
Autogamia	Es la transferencia del polen desde la antera de una flor al estigma de la misma, o, a veces, al de una flor genéticamente idéntica (o sea, de la misma planta o del mismo clon). Es también la habilidad que tienen muchas especies vegetales de lograr con éxito su fertilización natural. Se llama también autopolinización.
Biotecnología	Toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos.
Cigoto	Célula resultante de la unión del gameto masculino con el gameto femenino en la reproducción sexual de los organismos. Su citoplasma y sus orgánulos son siempre de origen materno al proceder del óvulo.
Clonación	En biología molecular, es el proceso en el que, mediante procedimientos de manipulación del DNA, se producen copias múltiples de un único gen o de un segmento de DNA.

Codominancia	Es la situación en la que un individuo heterocigótico exhibe el fenotipo de ambos alelos de un gen específico.
Cromosoma	Organización lineal continua de genes y de otro DNA, además de proteínas y del ARN asociado.
Deleción	Es una clase especial de mutación en que se pierde parte del DNA de un cromosoma.
DNA	Ácido desoxirribonucleico, una cadena doble de nucleótidos unidos entre sí (en los que el componente azúcar es la desoxirribosa), que es la molécula fundamental en la trasmisión de los genes.
Fenotipo	(1) Forma en que se manifiesta un carácter (o grupo de caracteres) en un individuo determinado; (2) Apariencia externa perceptible de un genotipo específico.
F1, F2, F3,...	Notación abreviada que se usa para indicar las diferentes generaciones que ocurren en un experimento de mejoramiento. F1 es la primera generación filial, es decir, la descendencia del cruzamiento paterno; F2 es la segunda generación filial, o sea, la descendencia de la autofecundación o del cruzamiento de los individuos de la F1; y así sucesivamente.
Gen	Unidad básica, tanto física como funcional, de la herencia, que transmite información de una generación a la siguiente. Es un segmento de DNA que incluye una sección transcrita y un elemento regulador que permite su transcripción.
Genotipo	Composición específica de alelos de toda la célula o, comúnmente, de determinado gen o de un conjunto de genes.
Herencia	Proceso en el que se transmiten los rasgos genéticos de los progenitores a sus progenies.
Híbrido	Puede ser: (1) un individuo heterocigótico, o (2) un individuo descendiente de un cruzamiento entre progenitores de diferente genotipo.
Locus (pl. loci)	Sitio específico de un cromosoma donde está localizado un gen o un trozo definido de DNA.

Mutación	Alteración estructural permanente del DNA. En la mayoría de los casos, los cambios ocurridos en él no tienen ningún efecto o causan algún daño; ocasionalmente, una mutación puede mejorar la probabilidad de supervivencia de un organismo y pasar el cambio favorable a sus descendientes.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa. Método para amplificar una secuencia de DNA en grandes cantidades mediante una polimerasa estable al calor y con cebadores apropiados, los cuales dirigen la amplificación de la región del DNA que interesa.
Polimerasa	Término genérico para los enzimas que llevan a cabo la síntesis de un ácido nucleico, usando un patrón de ácido nucleico pre-existente y los nucleótidos apropiados (es decir, ribonucleótidos para el RNA y desoxirribonucleótidos para el DNA).
RNA	Ácido orgánico constituido por unidades de nucleótidos de adenina (A), guanina (G), citosina (C) y uracilo (U) que se repiten, cuyos componentes de ribosa están unidos con enlaces de tipo fosfo-diester.
Recombinación	También llamada sobrecruzamiento. Es la producción de una molécula de DNA con segmentos derivados de más de una molécula del DNA de los progenitores. En los organismos eucariotas, este proceso se realiza mediante el intercambio recíproco de DNA entre cromátidas no hermanas de un par homólogo de cromosomas durante la profase de la primera división meiótica. La recombinación permite a los cromosomas la reorganización de su material genético, y de este modo incrementa el potencial de la diversidad genética.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour-Esquivel A. y E.J. Vincent (1994), "Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales", CATIE, http://books.google.com.mx/books?id=T9QOAQAAIAAJ&pg=PP3&source=gbs_selected_pages&cad=3#v=onepage&q&f=false.
- Akasaka M., Y. Ueda y T. Koba (2003), "Karyotype analysis of wild rose species belonging to septets B, C and D by molecular cytogenetic method", *Breeding Science* 53, pp. 177-182.
- Álvarez, Martha (2005), *Rosas*, Buenos Aires, Albatros.
- Al-Khalifah, N.S., S. Hadi y F. Khan (2005), "Influence of sucrose concentration on *in vitro* growth of five Rose (*Rosa hybrida* L.) cultivars", *Plant Tissue Cult* 15(1), pp. 43-49.
- Anderson, N. y D. H. Byrne (2007), "Methods for rosa germination", *Act Hort* (ISHS) 751, pp. 503-507.
- ASERCA (Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria) (2008), "La Floricultura", *Boletín ASERCA Regional Peninsular*, México, SAGARPA.
- Arzate-Fernández, A.M. (2001), *Fisiología Vegetal, Apuntes*, México, UAEM, 109 pp.
- Asano G. y S. Tanimoto (2002), "Plant regeneration from embryogenic calli derived from immature seeds in miniature rose cultivar 'Shortcake'; somaclonal variation, cytological study and RAPD analysis", *Plant biotechnology* 19(4), pp. 271-275.
- Atienza, S.G., A.M. Torres, T. Millan y J.I. Cubero (2005), "Genetic diversity in *Rosa* as revealed by RAPDs", *Agric. Conspectus Sci.* 70, pp. 75-85.
- Azofeifa-Delgado, A. (2006), "Uso de los marcadores moleculares en plantas: aplicaciones en frutales del trópico", *Agronomía Mesoamericana* 17(2), pp. 221-242.
- Bañon Arias, S., D. Cifuentes Romo, J.A. Fernández Hernández y A. González Benavente-García (1993), *Gerbera, lilium, tulipán y rosa*, Mundi-Prensa.

- Blechert, O. y T. Debener (2005), “Morphological characterization of the interaction between *Diplocarpon rosae* and various rose species”, *Plant Pathology* 54, pp. 82-90.
- Blog jardinería (2014), “Todo sobre Rosales (II)”, <http://www.blogjardineria.com/rosales-2/> (consultado el 15 de abril de 2014).
- Blogodisea (2014), “La reproducción de las plantas por semillas”, <http://www.blogodisea.com/reproduccion-plantas-semillas.html> (consultado el 15 de abril e 2014).
- Bruneau, A., J.R. Starr y S. Joly (2007), “Phylogenetic relationships in the Genus Rosa: New evidence form chloroplast DNA sequences and an appraisal of current knowledge”, *Systematic Botany* 32(2), pp. 366-378.
- Caneva, S. (1998), *El rosal*, Buenos Aires, Albatros, pp. 252-280.
- Canli, A. F. (2003), “A review on thornless roses”, *Pakistan Journal of Biological Sciences* 6(19), pp. 1712-1719.
- Canli F. A. y S. Kazaz (2009), “Biotechnology of roses: progress and future prospects”, *Sdü Orman Fakültesi Dergisi* Seri: A, Sayı: 1, pp. 167-183.
- Casanova E., M.I. Trillas, LL. Moyssset y A. Vainstein (2005), “Influence of rol genes in floriculture”, *Biotech Advances*, 23, pp. 3-39.
- Castillo C.F., E. Álvarez, E. Gómez *et al.* (2010), “Mejoramiento nutricional de la rosa para el manejo de *Peronospora sparsa* Berkeley, causante del mildew vellosa”, *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 34(131), pp. 137-142.
- Cardone S., S. Olmos, V. Echenique (2004), *Variación somaclonal*, V. Echenique, C. Rubinsteir y L. Mroginski (eds.), Argentina, Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología, INTA.
- Carelli B.P. y S. Echeverrigaray (2002), “An improved system for the *in vitro* propagation of rose cultivars”, *Scientia Horticulturae* 92, pp. 69-74.
- Carneiro, V.T.C., D.M.A. Dusi y J.P.A. Ortiz (2006), “Apomixis occurrence, applications and improvement”, en *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, vol. 1, Global Science Books, <http://globalsciencebooks.com/samples/Volume1sample.pdf>.
- Castilla, Yaneslis (2005), “Revisión bibliográfica: Cultivo de tejidos de rosas (*Rosa* sp.): un acercamiento a investigaciones recientes”, *Cultivos tropicales* 26(4), pp. 43-47.

- Celestino C., I. Hernández, E. Carneros, D. López-Vela y M. Toribio (2005), “La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal”, *Invest Agrar: Sist Recur For* 14(3), pp. 345-357.
- Channeliere, S., S. Riviere, G. Scalliet, *et al.* (2002), “Analysis of gene expression in rose petals using expressed sequence tags”, *FEBS Lett*, 515, pp. 35-38.
- Chmelnitsky, I., E. Khayat, N. Zieslin (2003), “Involvement of RAG, a rose homologue of AGAMOUS, in phyllody development of *Rosa hybrida* cv. Motrea”, *Plant Growth Regul*, 39, pp. 63-66.
- Colombian Products Guide for Importers (2004), *Productos de Colombia A.C.*, Colombia, <http://www.productsofcolombia.com/main/Colombia/Flowers.asp> (consultado el 28 de abril de 2014).
- CORPEI-CICO (Centro de Inteligencia Comercial) (2006), *Perfiles de producto, perfil de las flores*, Ecuador, Pontificia Universidad Católica de Ecuador.
- Crespel, L., D. Zhang, J. Meynet, Y. Jacob, y S. Gudin (2001), “Identification of apomictic plants in *Rosa hybrida* L. by AFLP’s”, *Acta Hort*, (ISHS) 547, pp. 51-55.
- Crespel L., A. Pernet, M. Le Bris, S. Gudin y L. Hibrand Saint Oyant (2009), “Application of ISSR for cultivar identification and assessment of genetic relationships in rose”, *Plant Breeding*, www.3.interscience.wiley.com.
- Datta, S.K., D. Chakrabarty, Mandal AKA Deepti, P. Misra y M. Saxena (2002), “In-vitro petal culture and callus formation in *Rosa* species”, *Indian Journal of Agricultural Sciences* 72, pp. 271-276.
- Debener, T. (1999), “Genetic analysis of horticulturally important morphological and physiological characters in diploid roses”, *Gartenbauwissenschaft* 64 pp. 14-20.
- Debener, T. y M. Linde (2009), “Exploring complex ornamental genomes: the rose as a model plant”, *Plant Critical Reviews in Plant Sciences*, 28:4, pp. 267-280.
- Díaz M.L., D.C. Zappacosta, P.M. Franzone y R.D. Ríos (2004), *Transformación genética*, V. Echenique, C. Rubinsteir y L. Mroginski (eds.), Argentina, Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología, INTA.
- Drefahl A., M.G. Quoirin y F.L. Cuquel (2007), “Micropropagation of *Rosa x hybrida* cv. Vegas via axillary buds”, *Acta Hort* (ISHS) 751, pp. 407-411.
- Dohm A., C. Ludwig, K. Nehring y T. Debener (2001), “Somatic embryogenesis in roses”, *Acta Hort* (ISHS) 547, pp. 341-347.

- Ercisli, S. (2005), “Rose (*Rosa* spp.) germplasm resources of Turkey”, *Genetic Resources and Crop Evolution* 52, pp. 787-795.
- Ercisli, S. (2007a), “Determination of pollen viability and *in vitro* pollen germination of *Rosa dumalis* and *Rosa villosa*”, *Bangladesh J. Bot* 36(2), pp. 185-187.
- Ercisli, S. (2007b), “Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species”, *Food Chemistry* 104, pp. 1379-1384.
- Esitken, A. y S. Ercisli (2001), “The effect of some hormones on the callus induction in *Rosa canina* and *Rosa dumalis in vitro*”, *Ziraat Facultesi Dergisi* 32, pp. 125-128.
- Escandón A. S., P. Marinangeli y M. Pérez de la Torre (2003), *Avances de la biotecnología en cultivos ornamentales, en biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*, Ediciones ArgenBio.
- Escandón, A., M. Pérez De la Torre, M.S. Soto, R.N. Zelene (2005), “Identificación de clones selectos de *Nierembergia linariaefolia* mediante microsátélites anclados”, *RIA* 34(1), pp. 5-17.
- Esselink G.D., M.J.M. Smulders y B. Vosman (2003), “Identification of cut rose (*Rosa* hybrid) and rootstock varieties using robust sequence tagget microsatellite site makers”, *Theor Appl Genet* 106, pp. 277-286.
- Fatih Ali Canli (2003), “A review on thornless roses”, *Pakistan Journal of Biological Sciences* 6(19), pp. 1712-1719.
- Fernández-Escobar, R., G. Gómez-Valledor y L. Rallo (1981), “Pollen germination of olive cultivars”, *Aula Dei* 15, pp. 3-4.
- Folta, K. M., S. E. Gardiner (eds.) (2009), *Genetics and genomics of Rosaceae, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models* 6, Springer Sciences.
- Ganga Network (2014), “Todo sobre las rosas”, http://rosas.info/articulos/tipos-de-rosas-rosales-antiguos_6, España (consultado el 14 de abril de 2014).
- Gudin S. (2000), “Rose: Genetics and Breeding”, en Jules Janick (ed.), *Plant Breeding Reviews*, vol. 17, John Wiley and Sons Inc., pp. 159-189.
- Gudin, S., L. Arene y C. Bulard (1991), “Influence of season on rose pollen quality”, *Sexual plant reproduction* 4, pp. 113-117.
- Guterman, I., M. Shalit, N. Menda *et al.* (2002), “Rose scent: genomics approach to discovering novel floral fragrance-related genes”, *Plant Cell* 14, pp. 2325-2338.

- Günes M., Ç. Çekic e Y. Edizer (2005), “Determination of pollen quantity, pollen viability and pollen germination in some dogrose species (*Rosa* section *Caninae*)”, *Act Hort* (ISHS) 690, pp. 211-216.
- Gobierno del Estado de México (GEM) (2008), *Revista conocer*, México, 6 pp.
- Haserk, R. (1980), *Introducción a la Floricultura*, San Diego, Academic Press, pp. 102-104.
- Hartmann, H.T. y D.E. Kester (2001), *Plant propagation, principles and practices*, New Jersey, Prentice-Hall.
- Hattendorf, A., M. Linde, L. Mattiesch, T. Debener, H. Kaufmann (2004), “Genetic analysis of rose resistance genes and their localization in the rose genome”, *Act Hort* (ISHS) 651, pp. 123-130
- Hodson de Jaramillo E. (2005), “Transformación genética de plantas para resistencia a virus”, *Rev. Acad. Colomb. Cienc* 29(110), pp. 5-24.
- Hoşafçı, H., Arslan, N. y E.O. Sarihan (2005), “Propagation of dog roses (*Rosa canina* L.) by seed”, en *Acta Hort* (ISHS) 690, pp. 159-164.
- Hussein S., R. Ibrahim y A. Ling Pick Kiong (2006), “Somatic embryogenesis: an alternative method for *in vitro* micropropagation”, *Iranian Journal of Biotechnology* 4(3), pp. 156-161.
- PROECUADOR (Instituto de Promoción de Exportaciones e Importaciones) (2010), *Flores*, Ecuador, Ministerio de Comercio Exterior, <http://www.proecuador.gob.ec/expotadores/sector/flores> (consultado el 15 de abril de 2014).
- InfoAgro (2014), “El cultivo de las rosas para corte (1ª parte)”, <http://www.infoagro.com/flores/flores/rosas.htm> (consultado el 15 de abril de 2014).
- Iqbal J. M., MM. Khan, B. Fatima, M. Asif y M. Abbas (2003), “*In vitro* propagation of ‘Hybrid Tea’ roses”, *Pak. J. Agri. Sci.* 40(3-4), pp. 155-162.
- Jacob, Y. y F. Ferrero (2003), “Pollen Grains and Tubes”, en A.V. Roberts, T. Debener, S. Gudin (eds), *Encyclopedia of Rose Science*, vol. 2, Elsevier, pp 518-523.
- Joly, S., J.R. Starr, W. Lewis, A. Bruneau (2006), “Polyploid and hybrid evolution in roses east of the Rocky Mountains”, *American Journal of Botany* 93(3), pp. 412-425.
- Jordano, B.P. (s.a.), “Utilidad y aplicaciones de técnicas moleculares en ecología y conservación de especies”, Perú, Estación Biológica de Doñana, CSIC, <http://ebd10.ebd.csic.es/pdfs/resumen.pdf> (consultado el 28 de abril de 2014).

- Kamo K., B. Jonés, J. Castellón, J. Bolar y F. Smith (2004), “Dospersal and size fractionation of embryogenic callus increases the frequency or embryo maturation and conversion in hybrid tea roses”, *Plant Cell Rep.*, 22, pp. 787-792.
- Kay Thi Oo, Aye Aye Khai y Khin Myat Lwin (2008), “Micropropagation of rose (*Hybrid Rose* spp.) by *in vitro* culture technique”, GMSARN International Conference on Sustainable Development: Issues and prospects for the GMS.
- Kaufmann, H., L. Mattiesch, H. Lorz, y T. Debener (2003), “Construction of a BAC library of *Rosa rugosa* Thunb and assembly of a contig spanning Rdr1, a gene that confers resistance to black spot”, *Mol. Genet. Genom.* 268, pp. 666-674.
- Kaul K., D. Karthigeyan, N.K. Dhyani, R.K. Sharma y P.S. Ahuja (2009), “Morphological an molecular analyses of *Rosa damascena* x *R. bourburiana* interspecific hybrids”, *Scientia Horticulturae* 122, pp. 258-263.
- Kaur, N., R. Sharma, M. Singh, P.S. Ahuja (2007), “Molecular evaluation and micropropagation of field selected elites of *R. damascene*”, *Gen. Appl. Plant Physiology* 33(3-4), pp. 171-186.
- Kim C.K., J.D. Chung, S.H. Park *et al.* (s/a), “*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Rosa hybrida* using the green fluorescent protein (GFP) gene”, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78, pp. 107-111.
- Kim, S. W., S.C. Oh, D.S. In, y J.R. Liu (2003a), “Plant regeneration of rose (*Rosa hybrida*) from embryogenic cell-derived protoplast”, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73, pp. 15-19.
- Kim S.W., S.C. Oh, J.R. Liu (2003b), “Control of direct and indirect somatic embryogenesis by exogenous growth regulators in immature zygotic embryo cultures of rose”, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74, pp. 61-66.
- Kim S.W., S.C. Oh, J.R. Liu (2009), “Plant regeneration from the root-derived embryonic tissues of *Rosa hybrid* L. cv. Charming via combined pathway of somatic embryogenesis and organogenesis”.
- Kintzios S., C. Manos y O. Makri (1999), “Somatic embryogenesis from mature leaves of rose (*Rosa* sp.)”, *Plant Cell Rep.* 18, pp. 467-472.
- Kitahara, K. y S. Matsumoto (2000), “Rose MADS-box genes ‘MASAKO C1 and D1’ homologous to class C floral identity genes”, *Plant Sci*, 151, pp. 121-134.

- Kitahara, K., Y. Hibino, R. Aida, y S. Matsumoto (2004), "Ectopic expression of the roseAGAMOUS-likeMADS-box genes 'MASAKOC1 and D1' causes similar homeotic transformation of sepal and petal in *Arabidopsis* and sepal in *Torenia*", *Plant Sci*, 166, pp. 1245-1252.
- Koning-Boucoiran, C.F.S., O. Dolstra, C.G. Van der Linden *et al.* (2009), "Specific mapping of disease resistance genes in tetraploid cut roses", *Acta Hort* (ISHS) 836, pp. 137-142.
- Koopman W.J.M., V. Wissemann, K. De Cock *et al.* (2008), "AFLP makers as a tool to reconstruct complex relationships: a case study in *Rosa* (*Rosaceae*)", *Am. J. Bot.* 95(3), pp. 353-366.
- Kumar, A., A. Sood, U.T. Palni, A.K. Gupta y L.M.S. Palni (2004), "Micropropagation of *Rosa damascena* Mill from mature bushes using thidiazuron", *J Hortic Sci Biotechnol* 76(1), pp. 30-4.
- Lagunes Fortiz, E. (2009), "Transformación genética de ajo (*Allium sativum* L.) mediante *Agrobacterium tumefaciens*", Tesis de maestría del Colegio de Posgraduados. Posgrado en recursos genéticos y productividad fisiología vegetal, 95 pág.
- Lawrence, E. (ed.) (2003), *Diccionario Akal de Términos Biológicos*, España, Akal ediciones, 688 pp.
- LI, X., S.F. Kransnyanski y S.S. Korban (2002), "Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in *Rosa*", *J. Plant Physiol* 159, pp. 313-319.
- LI, X., K. Gasic, B. Cammue, W. Broekaert y S. Korban (2003), "Transgenic rose lines harboring an antimicrobial protein gen, *Ace-AMP1*, demonstrate enhanced resistance to powdery mildew (*Sphaeroteca pannosa*)", *Planta* 218, pp. 226-232.
- Linde, M., L. Matitiesch, y T. Denener (2004), "*Rpp 1*, a dominant gene providing race-specific resistance to rose powdery mildew (*Podosphaera pannosa*): molecular mapping, SCAR development and confirmation of disease resistance data", *Theor Appl Genet* 109, pp. 1261-1266.
- López Melida, Julio (1981), *Cultivo del rosal en invernadero*, Mundi-Prensa.
- MacPhail, V.J. y P.G. Kevan (2007), "Reproductive success and insect visitation in wild roses (*Rosa* spp.) preliminary resultus from 2004", *Acta Horticulture* 751, pp. 381-388.

- MacPhail, V. J., P.G. Kevan (2009), “Review of the breeding systems of wild roses (*Rosa* spp.)”, *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 3, (Special issue 1): 1- 13, Global Science Books.
- Ma, N., W. Cai, W. Lu, H. Tan y J. Gao (2005), “Exogenous ethylene influences flower opening of cut roses (*Rosa hybrida*) by regulating the gene encoding ethylene biosynthesis enzymes”, *Sci. China C Life Sci.* 48, pp. 434-444.
- Ma, N., H. Tan, X. Liu, J. Xue, Y. Li, J. Gao (2006), “Transcriptional regulation of ethylene receptor and CTR genes involved in ethylene-induced flower opening in cut rose (*Rosa hybrida*) cv. Samantha”, *J. Exp. Bot.* 57, pp. 2763-2773.
- Marchant R., J.B. Power, M.R. Davey, Chartier-Hollis y P.T. Lynch (1993), “Cryopreservation of pollen from two rose cultivars”, *Euphytica* 66, pp. 235-241.
- Marchant R., M.R. Davey, J.A. Lucas y J.B. Power (1996), “Somatic embryogenesis and plant regeneration in Floribunda rose (*Rosa hybrida* L.) cvs. Trumpeter and Glad Tidings”, *Plant Science* 120, pp. 95-105.
- Marchant R., J.B. Power, J.A. Lucas y M.R. Davey (1998), “Biolistic transformation of Rose (*Rosa hybrida* L.)”, *Annals of Botany* 81, pp. 109-114.
- Matthews, D., J. Mottley, I. Horan y A.V. Roberts (1991), “A protoplast to plant system in roses”, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 24, pp. 173-80.
- Marriot, M. (2003), “Modern (Post-1800)”, en A.V. Roberts, T. Debener, S. Gudin (eds.), *Encyclopedia of Rose Science*, vol. 1, Elsevier, pp. 402-409.
- Miranda de Larra, Jesús (1975), *Cultivos ornamentales*, AEDO.
- Mohapatra, A. y G. Rout (2005), “Identification and analysis of genetic variation among rose cultivars using random amplified polymorphic DNA”, *Naturforsch* 60, pp. 611-617.
- Muller, R., C.A. Owen, Z. Xue, M. Welander y B.M. Stummann (2000a), “Characterization of two CTR-like protein kinases in *Rosa hybrida* and their expression during flower senescence and in response to ethylene”, *J. Exp. Bot.* 53, pp. 1223-1225.
- Muller, R., S. Lind-Iversen, B.M. Stummann y M. Serek (2000b), “Expression of genes for ethylene biosynthetic enzymes and an ethylene receptor in senescing flowers of miniature potted roses”, *J. Hort. Sci. and Biotech* 75, pp.12-18.

- Muller, R y B.M. Stummann (2003), "Genetic regulation of ethylene perception and signal transduction related to flower senescence", *J. Food Agr. Environ* 1, pp. 87-94.
- Mohapatra A. y G.R. Rout (2005), "Study of embryo rescue in floribunda rose", *Plant cell Tiss Organ Cult* 81, pp. 113-117.
- Mottley J., K. Yakoya, D. Matthews, J. Squirrell y J.E. Wentworth (1996), "Protoplast fusion and its potencial role in the genetic improvement of roses", *Acta Hort* (ISHS) 424, pp. 393-398.
- Nak-Udom N., K. Kanchanapoom y K. Kanchanapoom (2009), "Micropropagation from cultures nodal explants of rose (*Rosa hybrid* L. cv. "Perfume Delight")", *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 31(6), pp. 583-586.
- Nybohm, H., G. Werlemark, D.G. Esselink, y B. Vosman (2005), "Sexual preferences linked to rose taxonomy and cytology", *Acta Hort* (ISHS) 690, http://www.actahort.org/books/690/690_1.htm, pp. 21-28,
- Nybohm H., G.D. Esselink, G. Welemark y B. Vosman (2004), "Microsatellite DNA marker inheritance indicates preferential pairing between two highly homologous genomes in polyploidy and hemisexual dog-roses, *Rosa* L. Sect. *Caninae* DC", *Heredity* 92, pp. 139-150.
- Ortiz, J.P., S.C. Pessino, C.L. Quarín (2004), "Manipulación de la apomixis y su aplicación en la agricultura", en *Biotecnología y mejoramiento vegetal*, V. Echenique, C. Rubinsteir, L. Mroginski (eds.), Argentina, Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología, INTA.
- Ozel C.A. y O. Arslan (2006), "Efficient micropropagation of English shrub rose 'Heritage' under in vitro conditions", *International Journal of Agriculture & Biology* 8(5), pp. 626-629.
- Pati, P.K. (2002), "Tissue, cell and protoplast culture studies in *Rosa damascena* Mill. and *Rosa bourboniana* Desp.", PhD thesis, Utkal University, Bhubaneswar, India.
- Pati P.K., M. Sharma y P.S. Ahuja (2004), "Isolation of microspore protoplast in *Rosa* L.", *Current Science* 87(1), pp. 23-24.
- Pati P.K., S.P. Rath, M. Sharma, A. Sood y P.S. Ahuja (2006), "In vitro propagation of rose: a review", *Biotechnology Advances* 24(1), pp. 94-114.

- Pérez-Tornero O., N. López-Pérez e I. Porras (2007), “Rescate y cultivo in vitro de embriones inmaduros de limonero”, *Actas de horticultura* núm. 48, Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, pp. 85-88.
- Picca, A., M. Helguera, N. Salomón y A. Carrera (2004a), “Marcadores moleculares”, en V. Echenique, V. N. Rubinstei y Mroginski, L. (eds.), *Biotechnología y mejoramiento vegetal*, Argentina, Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotechnología, Ediciones INTA, pp. 61-68.
- Picca A. y S. Cardone (2004b), “Polinización y fertilización *in vitro*”, en *Biotechnología y mejoramiento vegetal*, V. Echenique, C. Rubinsteir y L. Mroginski (eds.), Argentina, Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotechnología, INTA, Buenos Aires.
- Pichersky E. y Dudareva N. (2007), “Scent engineering: toward the goal of controlling how flowers smell”, *Trends in Biotechnology*, vol. 25 (3), pp. 105-110.
- Polci P. y P. Firedrich (2004), “Hibridación somática”, *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal*, Echenique, Rubinstein y Mroginski (eds.), Ediciones INTA.
- Quinche, G.O. (2009), “Control de botrytis (*Botrytis cinerea*) y mildiu veloso (*Peronospora sparsa*) en el cultivo de rosa (*Rosa sp.* Variedad Forever Young) mediante el uso de *Trichoderma harzianum* Rifai”, Tesis, Facultad de Recursos Naturales, Escuela de Ingeniería Agronómica, Riobamba, Ecuador.
- Quero, A.R., F. Enríquez, C.R. Morales y L. Miranda (2010), “Apomixis y su importancia en la selección y mejoramiento de gramíneas forrajeras tropicales”, *Revisión. Rev Mex Cienc Pecu* 1(1), pp. 25-42.
- Razavizadeh R. y A.A. Ehsanpour (2008), “Optimization of in vitro propagation of *Rosa hybrid* L. cultivar Black Red”, *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci* 3(1), pp. 96-99.
- Riaz, Atif (2006), “Assessment of genetic diversity in *Rosa species* base n phenotypic and molecular markers”, Tesis, Institute Horticultural Sciences University of Agricultural, Faisalabad, Pakistan, 179 pp.
- Ritz, C.M., H. Schmuths y V. Wisseman (2005), “Evolution by reticulation: European dogroses originated by multiple hybridization across the genus *Rosa*”, *Journal of heredity* 96(1), pp. 4-14.
- Roberts, A.V., Th. Gladis, H. Brumme (2009), “DNA amounts of roses (*Rosa* L.) and their use in attributing ploidy levels”, *Plant Cell Report* 28, pp. 61-71.

- Robles Sánchez, R. (1995), *Diccionario de genética y fitogenética*, Trillas.
- Rout G.R., A. Mohapatra, S. Mohan Jain (2006), "Tissue culture ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects", *Biotechnology Advances* 24, pp. 531-560.
- Rout, G. R., S. Samantaray, J. Mottley and P. Das (1999), "Biotechnology of the rose: a review of recent progress", *Scientia Horticulturae* 81, pp. 201-228.
- Roy, P.K., A.N.A. Mamun y G. Ahmed (2004), "In vitro plantlets regeneration of Rose", en *Plant Tissue Cult* 14(2), pp. 149-154.
- Sánchez-Chiang, N. y V.M. Jiménez (2009), "Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales", *Agronomía mesoamericana* 20(1), pp. 135-151.
- Sánchez-Monge, E. (1970), *Diccionario de genética*, Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas, 2ª ed.
- Scalliet, G., N. Journot, F. Jullien *et al.* (2002), "Biosynthesis of the major scent components 3,5-dimethoxytoluene and 1,3,5-trimethoxybenzene by novel rose O-methyltransferases", *FEBS Lett* 523, pp. 113-118.
- Schum A. y K. Hofmann (2001), "Use of isolated protoplast in rose breeding", *Acta Hort* (ISHS) 547, pp. 35-44.
- SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera) (2010), "Índice global de la actividad economía 2010", México, http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=10&Itemid=15 (consultado el 20 de abril de 2014).
- Siddhart, K.T., P.S. Amar, P.S. Aniruddha y N. Pravendra (2009), "Transcriptional activation of a 37 kDa ethylene responsive cysteine protease gene, *RbCPI*, is associated with protein degradation during petal abscission in rose", *Journal of Experimental Botany*, 60, pp. 2035-2044.
- Solís Ramos, L. Y. y A. Andrade Torres (2005), "¿Qué son los marcadores moleculares?", en *La Ciencia y el Hombre*, vol. XVIII, núm. 1, Universidad Veracruzana, Veracruz.
- Sproul, Jim (2007), "Hultemia roses and the red blotch", *RHA Spring Newsletter*.
- Tanaka, Y. y A. Ohmiya (2008), "Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways", *Curr. Opin. Biotechnol* 19, pp. 190-197.

- Tanaka, Y. y A. Ohmiya (2009), “The biology of hybrid tea rose (*Rosa x hybrida*)”, [http://www.health.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/rose3/\\$FILE/biologyrose09](http://www.health.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/rose3/$FILE/biologyrose09), Australian Government, Department of Health and Ageing Office of the Gene Technology Regulator (consultado en octubre de 2009).
- Ueda, Y. (2003), “Seed maturation and germination”, en A.V. Roberts, T. Debener, S. Gudin (eds.), *Encyclopedia of Rose Science*, vol. 2, Elsevier, pp. 623-626.
- Uggla, M. y B.U. Carlson-Nilsson (2005), “Screening of fungal diseases in offspring from crosses between *Rosa* sections *Caninae* and *Cinnamomeae*”, *Scientia Horticulturae* 104, pp. 493-504.
- Van der Mark F, J.P. Pijnacker-Hordijk, G.A.I. Varga *et al.* (1990), “In vivo transformation of clonal *Rosa canina* rootstocks with *Agrobacterium rhizogenes*”, *The Journal of Genetics and Breeding* 44, pp.263-8.
- Vielle Calzada, Jean-Philippe, Charles F.Crane, David M. Stelly (1996), “Apomixis: The asexual revolution”, *Science* vol. 274, núm. 22.
- Vergne, P., M. Maene, G. Gabant *et al.* (2010), “Somatic embryogenesis and transformation of the diploid *Rosa chinensis* cv Old Blush”, *Plant Cell Tiss Organ Cult* 100, pp. 73-81.
- Walker, S., Z. Mandegaran, A.M. Roberts (1996), “Screening roses for resistance to *Diplocarpon rosae*”, *Acta Hort* (ISHS) 424, pp. 209-214.
- Walker, S. (1996), “A discussion of the consumer acceptance of genetic transformation in roses”, *Acta Hort* (ISHS) 424, pp. 389-392.
- Wang, D., J. Fan, R.S. Ranu (2004a), “Cloning and expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase cDNA from *Rosa x hybrida*”, *Plant Cell Rep.* 22, pp. 422-429.
- Weigel, D. y E.M. Meyerowitz (1994), “The ABC’s of floral homeotic genes”, *Cell* 78, Cambridge, pp. 203-209.
- Werlemark, G., M. Uggla y H. Nybom (1999), “Morphological and RAPD markers show a highly skew distribution in a pair of reciprocal crosses between hemisexual dogrose species, *Rosa* sect. *Caninae*”, *Theor Appl Genet* 98, pp. 557-563.
- Werlemark, G. y H. Nybom (2005), “The importance of being mother-inheritance in dogroses, *Rosa* section *caninae*”, *Acta Hort* (ISHS) 690, pp. 113-118.

- Werlemark, G., H. Nybom (2009), "Dogroses: Botany, Horticulture, Genetics and Breeding", *Horticultural Reviews*, vol. 36, Janick, J. (ed.), John Wiley and Sons, Inc., New York, EE. UU., pp. 199-255.
- Whitaker, V. M. y J.M. Bradeen (2010), "*Rdr3*, a novel locus conferring black spot disease resistance in tetraploid rose: genetic analysis, LRR profiling, and SCAR marker development", en *Theor Appl Genet* 120, pp. 573-585.
- Whitaker, V. M., K. Zuzek y S.C. Hokanson (2007), "Resistance of 12 genotypes to 14 isolates of *Diplocarpon rosae* Wolf (rose blackspot) collected from eastern North America", *Plant Breeding* 126, pp- 83-88.
- Wim J.M.K., W. Volker, D.C. Katrien *et al.* (2008), "AFLP makers as a tool to reconstruct complex relationships: a case study in *Rosa* (*Rosaceae*)", *Am. J. Bot.* 95(3), pp. 353-366.
- Wisseman, V. y C. Ritz (2005), "The genus *Rosa* (Rosoideae, Rosaceae) revisited: molecular analysis of nrITS-1 and atpB-rbcL intergenic spacer (IGS) versus conventional taxonomy", *Botanical Journal of the Linnean Society* 147, pp. 275-290.
- Wu, S., N. Watanabe, S. Mita, Y. Ueda *et al.* (2003), "Two O-methyltransferases isolated from flower petals of *Rosa chinensis* var. *spontanea* involved in scent biosynthesis", *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96, pp. 119-128.
- Xu, Q., X. Wen y X. Deng (2005), "Isolation of TIR and non TIR NBS-LRR resistance gene analogues and identification of molecular markers linked to a powdery mildew resistance locus in chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt)", *Theor. Appl. Genet.* 111, pp. 819-830.
- Yambe Y., Yutaka Hori y Kiyotoshi Takeno (1992), "Levels of endogenous abscisic acid in rose achenes and leaching with activated charcoal to improve seed germination", *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 61(2), pp. 383-387.
- Yokoya, K., A.V. Roberts, J. Mottley, R. Lewis, P.E. Brandham (2000), "Nuclear DNA amounts in roses", *Annals of Botany* 85, pp. 557-561.
- Younis, A., A. Riaz, R. Ahmed y A. Raza (2007), "Effect of hot water, sulphuric acid and nitric acid on the germination of rose seeds", *Act Hort* (ISHS) 755, pp.105-108.
- Zhang, L. H. (2003), *Genetic Linkage Map in Tetraploid and Diploid Rose*, Clemson University, Clemson, SC.

Zlesak, D. C. (2007), “Flower Breeding and Genetics: Issues, challenges and opportunities for the 21st century”, en *Rose Rosa x hybrid*, Neil O. Anderson (ed.), pp. 714-715.

Zlesak, D.C., K. Zuzek y S. C. Hokanson (2007), “Rose pollen viability over time at varying storage temperatures”, *Act Hort (ISHS)* 751, pp. 337-343.

Técnicas tradicionales y biotecnológicas en el mejoramiento genético del rosal (Rosa spp.) de Amaury Martín Arzate-Fernández, Mónica Deneb Bautista-Puga, José Luis Piña-Escutia, Jesús Ignacio Reyes-Díaz y Luis Miguel Vázquez-García, se terminó de imprimir en julio de 2014. El tiraje consta de 500 ejemplares.