

# Revisión bibliográfica CULTIVO DE TEJIDOS DE ROSAS (*Rosa* sp): UN ACERCAMIENTO A INVESTIGACIONES RECIENTES

Yanelis Castilla<sup>✉</sup>

**ABSTRACT.** Roses (*Rosa* sp) are among the most appreciated plants in the world, both in gardening and in the cut flower sector. This article shows the most recent results of the world, in relation to the application of *in vitro* tissue culture propagation of different species and varieties of roses. Nowadays, the culture of buds and shoots, calluses and nodos are among the most used techniques. In general, modern shrubs are the most propagated roses, although the miniature potted roses still represent a wide area of investigation.

**RESUMEN.** Las rosas (*Rosa* sp) constituyen plantas muy apreciadas en todo el mundo, tanto en la jardinería como en el sector de las flores de corte. En el presente artículo se dan a conocer los resultados más recientes que se han obtenido a nivel internacional, con respecto a la aplicación del cultivo de tejidos para la propagación *in vitro* de distintas especies y variedades de rosas. Entre las técnicas más utilizadas actualmente se encuentran el cultivo de yemas y brotes, callos y nodos. De manera general, los rosales modernos son los más propagados, con excepción de las rosas en miniatura, que aún representan un amplio campo a investigar.

**Key words:** *Rosa* sp, tissue culture, plant growth substances

**Palabras clave:** *Rosa* sp, cultivo de tejidos, sustancias de crecimiento vegetal

## INTRODUCCIÓN

Desde los inicios de la humanidad, el hombre sintió la necesidad de cultivar plantas que, más allá de su utilidad alimentaria, embellecieran el entorno, ya fuera por su porte o por el atractivo de sus flores. Entre estas plantas, conocidas como ornamentales, unas de las más cultivadas en todo el mundo son las rosas (*Rosa* sp). Resulta difícil encontrar un jardín donde no se cultive alguna especie o variedad de estas plantas, consideradas como la flor número uno por las grandes civilizaciones.

De acuerdo con su origen, actualmente las rosas pueden clasificarse en tres grupos (1):

**Especies silvestres de rosas:** las que originalmente crecen en la naturaleza y constituyen los ancestros de las demás rosas. La mayoría presenta flores pequeñas, solitarias, con cin-

co pétalos, generalmente de color rosado, amarillo o blanco.

**Rosales antiguos:** híbridos de las especies silvestres, considerados hasta 1867 en que surgió el primer rosal moderno: el híbrido del té.

**Rosales modernos:** constituyen el 95 % de los rosales que se cultivan en la actualidad. Son más resistentes a las enfermedades y sus flores perduran por más tiempo. Se clasifican en ocho grupos, entre los que se destacan comercialmente las rosas arbustivas, trepadoras, tapizantes y rosas en miniatura. Estas últimas generalmente no sobrepasan una altura de 45 cm y resultan ideales para sembrar en macetas.

Las distintas especies de rosas han sido sometidas durante muchos años a un proceso continuo de selección e hibridaciones, que ha traído como resultado la aparición de nuevas variedades, por lo que actualmente existen cerca de 30 000 (2).

Sin embargo, existen también otras técnicas, como las del cultivo de tejidos, que investidas de mayor actualidad y aunque menos conocidas, permiten la rápida introducción de variedades de rosas, así como la

mejora por mutagénesis y selección *in vitro*. El cultivo de tejidos se puede definir como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales. Otras ventajas consisten en que posibilitan aumentar el coeficiente de multiplicación, producir independientemente de las condiciones ambientales y facilitar la comercialización de las especies vegetales (3). A pesar de la utilidad de estas técnicas, la información concerniente a su aplicación en el cultivo *in vitro* de la rosa se encuentra muy dispersa, por lo que en el presente trabajo el objetivo fue dar a conocer los resultados más recientes que se han obtenido a nivel internacional, con respecto a la aplicación del cultivo de tejidos para la propagación de distintas especies y variedades de rosas.

## DESARROLLO

Entre las técnicas del cultivo de tejidos más empleadas para la propagación *in vitro* de las rosas, se encuentran el cultivo de yemas y bro-

Yanelis Castilla, Reserva Científica del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP 32 700.

✉ yanelis@inca.edu.cu

tes, callos y nodos. Otros métodos, como el cultivo de embriones y protoplastos, presentan una mayor especificidad y complejidad, por lo que son menos utilizados con este fin. *Cultivo de yemas y brotes.* Al realizar la propagación de plantas a partir de yemas y brotes jóvenes, las mutaciones espontáneas que se pueden presentar son mínimas, ya que estos derivan directamente de meristemos organizados y están sujetos a bajos niveles de variación (4). Se considera yema al rudimento de un vástago, que se forma habitualmente en las axilas de las hojas y suele estar protegida por una serie de hojas, mientras que brote es el término usual con que se designa el vástago en estado de desarrollo, a partir de la yema hasta que ha terminado su crecimiento (5).

En *R. hybrida* se determinó el efecto de reguladores del crecimiento, fuente de carbono y sales en el medio sobre la proliferación *in vitro* de explantes de yemas laterales, de 10 cultivares distintos. El medio finalmente adoptado, incluyó las formulaciones de sales de Quoirin y Lepoivre, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa, 3 mg.L<sup>-1</sup> de BA y 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA. En estas condiciones, se obtuvo un ritmo de multiplicación de 30.3 plántulas por explante, luego de 180 días (6).

En cambio, el medio MS resultó el mejor en cuanto al rápido establecimiento y la diferenciación de yemas axilares de *Rosa hybrida* (7). Estas fueron sembradas en medio MS con 2 ó 4 mg.L<sup>-1</sup> de KIN o 2 ó 4 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, individualmente o en combinación con 0.1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA. El empleo de 4 mg.L<sup>-1</sup> de BAP permitió la inducción de múltiples brotes. En medio suplementado con 2 mg.L<sup>-1</sup> de KIN seguido de 2 mg.L<sup>-1</sup> de BAP se obtuvieron brotes largos con el mayor número de hojas, aunque no desarrollaron raíces en el medio de enraizamiento. Los brotes que se regeneraron del medio que contenía 0.25 mg.L<sup>-1</sup> de BAP y 0.25 mg.L<sup>-1</sup> de KIN respondieron más eficientemente al enraizamiento y a la aclimatación al transferirlos al invernadero.

En tres cultivares de *R. hybrida* fue desarrollado un sistema de rege-

neración de yemas, a partir de brotes *in vitro*. La máxima frecuencia de regeneración de yemas (93.4 % media de los tres cultivares) y el mayor número de yemas por explante regenerante (3.7), se obtuvieron cuando los folíolos fueron cultivados en medio MS con 6.8 μM de TDZ y 0.49 μM de IBA por siete días en la oscuridad y luego subcultivados en medio MS de regeneración suplementado con 2.22 μM de BA y 0.049 μM de IBA expuesto a una radiación fotosintéticamente activa (PAR) de 15 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. La capacidad de formación de yemas también estuvo significativamente afectada por el genotipo y el ambiente. La adición de nitrato de plata al medio de inducción aumentó significativamente el porcentaje de regeneración en los tres genotipos probados. Los brotes elongados fueron cortados y enraizaron mejor en 1/2 MS sin reguladores del crecimiento (8).

El uso de sustancias que incrementen la proliferación de brotes, resulta muy aconsejable para la multiplicación comercial. Dos compuestos como el tiazurón (TDZ) y forclorfenurón (CPPU) son capaces de aumentar la brotación en *R. hybrida*, cvs. Sonia y Raktagandha, al sumergir por un corto período de tiempo los explantes en 100 y 200 μM, respectivamente, antes de subcultivarlos en medio de proliferación normal (9). A su vez, el TDZ es útil para inducir la floración *in vitro*, pues la combinación de 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de este con 0.1 mg.L<sup>-1</sup> de NAA en medio MS, aumentó a un 49 % la producción de flores en el cv. Orange Parade (10).

La micropropagación de *R. hybrida* se ve incrementada al utilizar anti-auxinas. Brotes de los cultivares Super Star y Sonia fueron multiplicados por 10 subcultivos a intervalos de cuatro semanas en medio MS suplementado con 22.19 μM de BA, 1.07 μM de ANA y 0.05 μM de AG<sub>3</sub>. La adición de las anti-auxinas ácido triiodobenzoico (TIBA) (2 μM) y ácido 2,4,6 triclofenoxiacético (0.39 μM) en el medio de proliferación, incrementaron el número de brotes por explante y su longitud en ambos cultivares. El tratamiento con

TIBA también incrementó el número de hojas por brote y contenido de clorofila en la hoja (11).

*Cultivo de callos.* El callo representa un crecimiento desorganizado de células obtenido a partir de determinado tejido. Su formación comienza con el aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, que posteriormente desdiferencian ante la presencia de auxina exógena en el medio de cultivo. Las células proliferan continua y aceleradamente, dando origen a una masa amorfa de tejidos (12). Aunque se considera que el cultivo de callos puede constituir una fuente de variación genética (4), tiene la ventaja de que permite multiplicar rápidamente el material vegetal.

En *Rosa sp.*, se ha investigado el desarrollo de callos a partir de explantes de pétalos de siete cultivares (Contempo, America's Junior Miss, Manasi, Mrinalini, Preyasi, Sylvia y Queen Elizabeth), en distintos medios, resultando los más satisfactorios para la formación de callos: el MS con 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA y 1 mg.L<sup>-1</sup> de BA y el Schenk y Hildebrandt (SH) con 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4D y 1 mg.L<sup>-1</sup> de BA, aunque no se observó embriogénesis somática ni organogénesis en ninguno de los medios (13).

El efecto de algunas hormonas en la inducción de callos también ha sido objeto de estudio en *Rosa canina* y *Rosa dumalis*. Los segmentos nodales de 0.4 a 0.5 cm fueron sembrados en medio MS y se detectó que en *R. canina* la inducción de callos era alta con elevadas concentraciones de ANA y BA, mientras en *R. dumalis* bajas concentraciones de ANA y altas de BA tuvieron el mismo efecto (14). En *R. hybrida* también ha sido inducida la morfogénesis *in vitro* de callos (15).

En *R. damascena* cv. Noorjahan y *R. chinensis landrace*, dos especies productoras de aceites esenciales, ha sido investigada la organogénesis, tanto directa como indirecta. Para el primer aspecto, se probaron 12 combinaciones de medios, en las cuales el medio basal MS fue suplementado con distintas concentraciones de 6-BAP y ANA, para inducir regeneración de brotes

adventicios a partir de explantes nodales de las dos especies. Para lograr la organogénesis indirecta se empleó el medio MS  $\frac{1}{2}$  con  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP, suplementado con  $\text{AG}_3$  y disulfato de adenina (ADS). En ambos experimentos se obtuvo regeneración de brotes a partir de los explantes nodales y los callos (16).

El genotipo de la planta y el tipo de explante utilizado son factores que influyen también en la inducción y proliferación de callos, como fue demostrado (17) para seis cultivares de *R. floribunda*. Tres tipos de explantes fueron cultivados en medio MS con BA, ANA y 2,4-D para obtener callos, alcanzándose la mayor frecuencia de inducción, en el cultivar Dacapo, usando las bases de las yemas como explantes, aunque el mejor crecimiento de los callos fue observado en Lili Marlene, al emplear pétalos. **Cultivo de nodos.** Los nodos o nudos son los segmentos del tallo de la planta donde se encuentran las hojas, generalmente cubriendo a las yemas axilares, por lo que constituyen puntos de ramificación y crecimiento. Los esquejes constituyen precisamente los fragmentos de estos nodos, con el objetivo de sembrarlos en el medio de cultivo o en la tierra.

El efecto de dos citoquininas antagonistas (2-cloro-4-ciclobutilamino-6-etilamino-1,3,5-triazina y N-(4-piridil)-O-(4-clorofenil)-carbamato) fue estudiado en la brotación de yemas de nodos sencillos de dos cultivares de *R. hybrida* (Madelon y Motrea), que difieren en su dominancia apical. Los compuestos se aplicaron en el medio de cultivo a tres concentraciones distintas, por separado o en combinación con BA. Las citoquininas antagonistas redujeron el número de yemas brotadas en ambos cultivares a distintas longitudes, dependiendo su efecto fuertemente de la concentración aplicada y de la duración del período de cultivo. La sustitución de las citoquininas con BA en el medio dio como resultado una superación de la supresión de la brotación de las yemas. Ambos compuestos inhibieron significativamente el sobrecrecimiento de las yemas (18).

Para la micropropagación de *R. damascena* se han utilizado segmentos simples de nodos, de arbustos maduros. El efecto del TDZ fue comparado con el del BA en la proliferación de brotes *in vitro*. Los cultivos iniciados en medio con TDZ y/o cultivados continuamente en medio con TDZ, por 32 ó 48 semanas, exhibieron considerablemente mayor proliferación de brotes y crecimiento durante el cultivo subsiguiente en medio con BA. Los brotes inducidos en medio con TDZ y subcultivados 8-12 veces en medio con BA, desarrollaron la capacidad de crecer y proliferar en medio libre de reguladores del crecimiento. Los microbrotes de cultivos inducidos con TDZ enraizaron fácilmente en medio con IBA ( $10 \mu\text{M}$ , 12 h). Las plantas enraizadas fueron transferidas exitosamente a macetas, obteniéndose un 70 % de supervivencia (19).

Otros plantean la siembra de explantes nodales (1.5-3 cm) de 10 cultivares de rosas en medio MS con varios niveles de AIA y BAP (20). En medio con  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA se produjeron múltiples brotes. La adición de nitrato de plata al medio posibilitó la reducción de la abscisión foliar y aumentó el crecimiento de brotes axilares. Las plántulas crecidas *in vitro* fueron enraizadas en  $\frac{1}{4}$  MS con  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA y  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de IBA. El enraizamiento fue evidente en ocho cultivares, mientras que dos no respondieron (Windy City y Doris Tysterman). Las plántulas resultantes fueron aclimatizadas y crecidas en macetas, desarrollándose normalmente.

En condiciones *in vitro*, resulta importante la inducción de raíces de los explantes, con vistas a su posterior adaptación en tierra. En *Rosa centifolia* Linn, var. Andhra Red, uno de los medios más eficaces para la rizogénesis de microesquejes resulta ser el MS ( $\frac{1}{2}$ ) con 15 % de sacarosa,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA y  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA, aunque el mayor número de raíces se obtiene en medio MS ( $\frac{1}{2}$ ) con sacarosa y  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de IBA (21). En cambio, en los cultivares Super Star y Sonia (*Rosa hybrida*), la formación de raíces se ve favorecida en

el medio MS ( $\frac{3}{4}$  macroelementos y  $\frac{1}{2}$  microelementos) suplementado, respectivamente, con  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de IBA,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA y  $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa, y con  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de IBA,  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA y  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa (22).

**Cultivo de embriones y protoplastos.** El cultivo *in vitro* de embriones ha sido una herramienta útil para la propagación de varias especies de rosa, que solo son viables mediante semillas y presentan dificultades para germinar convencionalmente. A través del cultivo de embriones ha sido posible, por ejemplo, superar la dormancia de las semillas e incrementar rápidamente el número de especies de rosales silvestres en la colección del Jardín Botánico de Montreal, Canadá, a partir de un número muy limitado de semillas obtenidas de instituciones botánicas de todo el mundo (23).

El principal criterio para la siembra de cultivares de rosas en regiones norteñas son: buena resistencia al viento, alta resistencia a enfermedades fúngicas y alta calidad de las flores en condiciones de humedad y bajas temperaturas en verano y otoño. Hasta cierto punto, la especie *R. rugosa* Thunb reúne estos requerimientos, pues 12 de sus variedades no necesitan cubierta durante el invierno, forman arbustos de 1.2 a 1.5 m de altura, tienen un período de floración continua y el color de la flor varía desde blanco ('Parsla') hasta rosado con el centro blanco ('Abelzieds') o púrpura ('Zilga'). No obstante, los métodos tradicionales de propagación no han tenido éxito en producir rosas de floración frecuente con flores amarillas o rojo brillantes, ni variedades trepadoras. Para expandir el programa de propagación, se empezó a desarrollar embriones estériles en cultivo. Los métodos *in vitro* han sido usados principalmente para los híbridos del té, más raramente para las minirosas y se ha intentado iniciar la embriogénesis somática en el cultivo de callos. Existe escasa información concerniente a las condiciones de cultivo de embriones de rosa inmaduros, por lo que los estudios se dirigen hacia dos direcciones: el

desarrollo de cultivos de callos con iniciación de embriones somáticos y la elaboración de tecnología para obtener semillas fértiles *in vitro* de embriones inmaduros aislados en estadios tempranos luego de cruces incompatibles (24).

Los protoplastos son células vegetales a las que les ha sido degradada la pared celular a través de procesos enzimáticos. Se obtienen como paso previo para lograr la hibridación somática, mediante la fusión de dos protoplastos (células) con dotaciones cromosómicas diferentes, lo que permite la introducción de material genético en el núcleo o citoplasma de la célula y que se transmita a la descendencia. De manera general, no es un método muy empleado en las rosas, aunque en *R. damascena* y *R. borboniana*, dos de las especies de mayor importancia comercial debido a su aroma y al contenido de aceites esenciales, se han establecido protocolos de micropropagación mediante segmentos nodales y se ha estudiado el cultivo de protoplastos, como alternativas viables para una rápida propagación y obtención de nuevas variedades (25).

*Otras aplicaciones del cultivo de tejidos en rosas.* Existen otras técnicas que aunque directamente no se incluyen dentro del cultivo de tejidos, se han visto beneficiadas por el desarrollo de este, como es el caso de las técnicas de transformación genética de plantas. Estas consisten en la transferencia de genes exógenos al interior del genoma vegetal, los cuales previamente han sido modificados *in vitro* para permitir su expresión (26).

Tejidos friables embriogénicos (TFE) de cultivos de filamentos de rosa (*R. hybrida* cv. Royalty) fueron obtenidos y cocultivados con *Agrobacterium tumefaciens* o *A. rhizogenes*, portando un vector con los genes neomicina fosfotransferasa II (npt II), glucuronidasa (GUS) o luciférase (LUC). Las colonias supuestamente transformadas fueron seleccionadas en kanamicina. De 50 a 60 líneas de callos embriogénicos transformados fueron

obtenidos de cada gramo de TFE inoculado con *Agrobacterium*. Los callos embriogénicos transformados fueron transferidos a medio de maduración para formar embriones somáticos, que luego produjeron plantas. La naturaleza transgénica de estas fue confirmada por ensayos enzimáticos, PCR e hibridación Southern. Aproximadamente 100 plantas transgénicas fueron establecidas en el suelo y florecieron en el invernadero. Este procedimiento facilita la introducción de genes deseables, especialmente los que controlan el color de la flor en cultivares comerciales de rosa (27).

Posiblemente el desarrollo de esta investigación haya servido de precedente a la creación de la rosa azul, pues se afirma que esta «ya está llegando» (28). Investigadores japoneses han creado la rosa azul tras varios años de investigación, al implantar el gen que codifica para la síntesis del pigmento azul en pensamientos. El color de la nueva rosa proviene enteramente del pigmento 'delphinidin', que no existe en las rosas naturales.

RAG, el gen homólogo del AGAMOUS de *Arabidopsis*, fue aislado de flores de rosas. Niveles de transcritos de RAG fueron examinados en órganos florales de flores normales del cv. Ragged Robin (*R. chinensis*), que no mostraron características de malformación; en flores normales y malformadas (mostrando los filodios) del cv. Motrea (*R. hybrida*) y flores completamente malformadas del mutante estable 'rosa verde' (*R. chinensis* 'Viridiflora'). La acumulación de transcritos de RAG fue evidente en todas las etapas del desarrollo del botón en flores normales de Ragged Robin y Motrea. Un nivel relativamente alto de RNA<sub>m</sub> de RAG, similar al encontrado en las flores normales, también estuvo presente en los órganos reproductores de flores malformadas de Motrea en estadios avanzados del desarrollo del botón (más de 10 mm de diámetro). No obstante, análisis más detallados revelaron que la acumulación de transcritos de RAG en órganos

malformes estaba restringida al saco del ovario de los pistilos transformados y no ocurrió en las partes que representan tubos del estilo transformados. La acumulación de transcritos de RAG no fue detectable en etapas tempranas del desarrollo en flores anormales del cv. Motrea ni en la rosa verde (29).

*Cultivo de tejidos en las rosas en miniatura.* Con respecto a las rosas en miniatura, los estudios referidos al cultivo de tejidos son más escasos.

Por ejemplo, ha sido investigado el crecimiento y desarrollo de plántulas de diversas poblaciones, en comparación con el de sus clones auto-enraizados, con el objetivo de seleccionar cultivares adaptados al cultivo en maceta. De manera general, las plántulas y sus clones se comportaron de forma similar, aunque el nivel de expresión de siete caracteres difirió significativamente. De esta manera, en las plántulas el botón floral se formó tempranamente, pero floreció después que sus clones. En el momento de la antesis, las plántulas presentaron brotes más cortos, menor número de hojas, mayor número de yemas florales, un mayor porcentaje de yemas axilares y menos pétalos por flor que sus clones (30).

La mayoría de las investigaciones se refieren a la influencia, sobre el desarrollo de las flores, de diversos factores ambientales como la temperatura (31), la aplicación exógena de fitohormonas (ácido abscísico y etileno) (32) y las estaciones del año (invierno y verano) (33). También existen informes acerca de los procedimientos más adecuados para lograr la desinfección de explantes, específicamente en el cultivar 'Baby Masquerade' (34).

Como se aprecia, resulta necesario profundizar en los estudios sobre técnicas del cultivo *in vitro*, como el cultivo de yemas y meristemas, así como la embriogénesis somática, aplicadas a las distintas variedades de rosas en miniatura, que constituyen plantas tan codiciadas y comercializadas en todo el mundo.

## REFERENCIAS

1. Garden Action. Growing roses made easy. [Consultado: 9-9-2004]. Disponible en: <www.gardenaction.co.uk>.
2. Tipos de rosas. [Consultado 9-9-2004]. Disponible en: <www.infojardin.com>.
3. Jiménez, E. A. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas, 1998. 400 p.
4. García, M. Metodología para la propagación masiva *in vitro* de *Eucalyptus saligna* Sm. [Tesis de Maestría]; Universidad de La Habana, 1999. 70 h.
5. Font Quer, P. Diccionario de Botánica. La Habana: Edición Revolucionaria, 1970.
6. Carelli, B.P. y Echeverrigaray, S. An improved system for the *in vitro* propagation of rose cultivars. *Scientia Horticulturae*, 2002, vol. 92, no. 1, p. 69-74.
7. Jayasree, N. *et al.*. Rapid *in vitro* propagation of *Rosa hybrida* through axillary buds. *Indian Journal of Horticulture*, 1998, vol. 55, no. 4, p. 344-348.
8. Ibrahim, R. *et al.*. Improvement of adventitious bud formation and plantlet regeneration from *in vitro* leaflet explants of roses (*R. hybrida* L.). *Acta Horticulturae*, 2000, no. 520, p. 271-279.
9. Singh, S. K. y Syamal, M. M. A short pre-culture soak in thidiazuron or forchlorfenuron improves axillary shoot proliferation in rose micropropagation. *Scientia Horticulturae*, 2001, vol. 91, no. 1-2, p. 169-177.
10. Wang, G. Y.; Yuang, M. F. y Hong, Y. *In vitro* flower induction in roses. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 2002, vol. 38, no. 5, p. 513-518.
11. Singh, S. K. y Syamal, M. M. Anti-auxin enhance *Rosa hybrida* L. micropropagation. *Biologia Plantarum*, 2000, vol. 43, no. 2, p. 279-281.
12. Gómez, R. Cultivos de células y tejidos. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara. Instituto de Biotecnología de las Plantas, 1998. 400 p.
13. Datta, S. K. *et al.*. *In vitro* petal culture and callus formation in *Rosa* species. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 2002, vol. 72, no. 5, p. 271-276.
14. Esitken, A. y Ercisli, S. The effect of some hormones on the callus induction in *Rosa canina* and *Rosa dumalis in vitro*. *Ziraat Facultesi Dergisi*, 2001, vol. 32, no. 2, p. 125-128.
15. Arif, M. B. y Khatamian, H. *In vitro* morphogenesis from callus of *Rosa hybrida*. *Quarterly*, 1996, vol. 24, no. 3, p. 104-110.
16. Ritika, G. *et al.*. Axillary and adventitious *in vitro* shoot proliferation in scented roses *Rosa damascena* and *Rosa indica*. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 2001, vol. 22, no. 4, p. 227-232.
17. Kuusiene, S. *et al.*. The influence of genotype and explant for callus induction and proliferation of *Rosa floribunda*. En: Proceedings of the International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding (4:200 jul. 2-7:Tampere). *Acta Horticulturae*, 2001, no. 560, p. 501-504.
18. Kapchina, T. V. *et al.*. Anticytokinin effect on apical dominance release in *in vitro* cultured *Rosa híbrida* L. *Biologia Plantarum*, 2002, vol. 45, no. 2, p. 183-188.
19. Kumar, A. *et al.*. Micropropagation of *Rosa damascena* Mill. from mature bushes using Thidiazuron. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2001, vol. 76, no. 1, p. 30-34.
20. Chakrabarty, D.; Mandal, A. K. y Datta, S. K. *In vitro* propagation of rose cultivars. *Indian Journal of Plant Physiology*, 2000, vol. 5, no. 2, p. 189-192.
21. Ganga, M.; Irulappan, I. y Chezhiyan, N. *In vitro* rhizogenesis of Andra Red rose (*Rosa centifolia* Linn). *South Indian Horticulture*, 2000, vol. 48, no. 48, p. 142-145.
22. Singh, S. K. y Syamal, M. M. Effect of media and physical factors on *in vitro* rooting in roses. *Horticultural Journal*, 2001, vol. 14, no. 1, p. 91-97.
23. Lauzer, D. y Laberge, C. Establishment of a collection of *Rosa* species through *in vitro* embryo culture. *HortScience*, 1996, vol. 31, no. 3, p. 458-459.
24. Rietska, D.; Jacobsone, G. y Rihtere, H. Classical breeding of *Rosa rugosa* roses and *in vitro* cultivation of immature embryos as an expanded resource for selection. [Consultado: 11-01-2005]. Disponible en: <www.actahort.org>.
25. Pati, P. K. *et al.*. Micropropagation, protoplast culture and its implications in the improvement of scented rose. En: Proceedings of the International Symposium on Rose Research and Cultivation (3:2001 may. 21-26:Herzliya. *Acta Horticulturae*, 2001, no. 547, p. 147-158.
26. Gil, V.; Martínez, S. y Mas, L. Transformación genética. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas, 1998. 400 p.
27. Firoozabady, E. *et al.*. Regeneration of transgenic rose (*Rosa hybrida*) plants from embryogenic tissue. *Bio/Technology*. 1994, no. 12, p. 609-613. [Consultado: 11-01-2005]. Disponible en: <www.nature.com>.
28. La rosa azul está llegando. [Consultado: 15-12-2004]. Disponible en: <www.revistaviveros.com.ar>.
29. Chmelnitsky, I.; Khayat, E. y Zieslin, N. Involvement of RAG, a rose homologue of AGAMOUS, in phyllody development of *Rosa hybrida* cv. Motrea. *Plant Growth Regulation*, 2003, vol. 39, no. 1, p. 63-66.
30. Dubois, L. A. M y Vries, D. P. de. Comparison of *Rosa chinensis* minima (Voss) Sims miniature seedlings and their clonal plants, with reference to selection for pot rose cultivars. *Journal of Genetics & Breeding*, 1997, vol. 51, no. 3, p. 181-184.
31. Steininger, J.; Pasion, C. C. y Lieth, J. H. Extension to a thermal unit model to represent nonlinearities in temperature response of miniature rose development. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2002, vol. 127, no. 3, p. 349-354.
32. Mueller, R. *et al.*. Effects and interactions of ethylene and abscisic acid in detached and intact miniature rose flowers. *Acta Horticulturae*, 2001, vol. 1, no. 53, p. 173-174.
33. Saraiva, J. A. y Brent, H. Influence of cultivar and seasonal growing environment on growth and postharvest characteristics of single-shoot pot rose plants. *HortScience*, 2004, vol. 39, no. 1, p. 158-164.
34. Salehi, H. y Kosh Khui, M. A simple procedure for disinfection of 'Baby Masquerade' miniature rose explants. *Scientia Horticulturae*, 1997, vol. 68, no. 1, p. 145-148.

Recibido: 24 de marzo de 2005

Aceptado: 8 de septiembre de 2005