

Floración *in vitro* – revisión de literatura

Wayner Montero-Carmona¹ y Víctor M. Jiménez^{2*}. *Autor para correspondencia.

¹Centro de Investigación y Desarrollo Agrícola Sostenible para el Trópico Húmedo, Escuela de Agronomía, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede Regional San Carlos, Costa Rica.

²Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Universidad de Costa Rica, 2060 San Pedro, Costa Rica. e-mail: victor.jimenez@ucr.ac.cr

RESUMEN

La floración *in vitro* puede ser inducida en diferentes estadios durante el desarrollo de las plantas *in vitro* mediante variaciones en los factores físicos y químicos relacionados con el cultivo de tejidos. Dentro de los factores físicos, el fotoperíodo y la temperatura son los que se han estudiado con más detalle. Su efecto inductivo puede variar en diferentes especies. Algunos factores físicos también pueden ser sustituidos por estímulos químicos. Los factores químicos que han sido descritos con más frecuencia en la literatura son algunos reguladores de crecimiento y la relación sacarosa/nitrógeno. Las citoquininas pueden inducir el desarrollo floral a partir de varios órganos; no obstante, altas concentraciones pueden inhibir la floración y ocasionar brotación de yemas vegetativas. Las giberelinas y las poliaminas (principalmente espermidina) presentan un efecto positivo en la inducción floral. De forma contrastante, el etileno y las auxinas han mostrado ser poderosos inhibidores de la floración *in vitro*. Sin embargo, las auxinas parecen ser necesarias durante los primeros estadios del desarrollo floral. Un aumento en la concentración de sacarosa en el medio de cultivo puede favorecer el desarrollo de flores *in vitro*; mientras que concentraciones altas de nitrógeno pueden estimular el desarrollo vegetativo de los explantes. No obstante, si las concentraciones de nitrógeno son muy bajas, el explante no se desarrolla bien. La presente revisión de literatura tiene como fin discutir los factores más comunes que participan en la inducción de la floración *in vitro*, así como presentar la literatura científica más relevante en el tema a partir de 1980.

Palabras clave: cultivo de tejidos, inducción floral, inductores, reguladores de crecimiento

ABSTRACT

In vitro flowering can be induced at different stages during development of *in vitro* plants by changes in chemical and physical factors related to the tissue culture process. Among the physical factors, photoperiod and temperature have been studied more detailed. Their inductive effect may vary in different species. Some physical factors can also be replaced by chemical stimuli. The chemical factors more frequently described in the literature are some growth regulators and the sucrose/nitrogen ratio. Cytokinins may induce flower development from various organs, but high concentrations can inhibit flowering and cause sprouting of vegetative buds. Gibberellins and polyamines (mostly spermidine) have a positive effect on flower induction. While, ethylene and auxin seem to be powerful inhibitors of *in vitro* flowering. However, auxins seem to be necessary during the early stages of floral development. An increase in the concentration of sucrose in the culture medium favor development of flowers *in vitro*, whereas a high concentration of nitrogen can stimulate vegetative growth of explants. Nevertheless, if the nitrogen concentration is too low, explants do not develop well. The aim of this literature review is to discuss most common factors related to *in vitro* flowering and to list the most relevant scientific literature about the subject from 1980 on.

Key words: flower induction, growth regulators, inducers, tissue culture

Abreviaturas: **2,4-D** Ácido 2,4-diclorofenoxiacético, **2iP** 2-isopentiladenina, **ABA** Ácido abscísico, **AC** Agua de coco, **AG₃** Ácido giberélico, **AIA** Ácido indol acético, **AIB** Ácido indol butírico, **ANA** Ácido naftalen acético, **BAP** Benciladenina, **CAct** Carbón activado, **CasHid** Caseína hidrolizada, **DSDPs** Plantas de día corto desplazado, **GA_x** Giberelina x, **LDPs** Plantas de día largo, **MES** Ácido 2 (N-morfolino) etanosulfónico, **MS** Murashige y Skoog (1962), **MT** Murashige y Tucker (1969), **PSF** Plantas sensibles al fotoperíodo, **Put** Putrescina, **PVP** Polivinilpirrolidona, **SAM** S-adenosil-L-metionina, **SAMDC** S-adenosil-L-metionina descarboxilasa, **SDPs** Plantas de día corto, **Spd** Espermidina, **Spm** Espermina, **TDZ** Tiazuron

Contenido

INTRODUCCIÓN

FACTORES QUE AFECTAN LA FLORACIÓN *IN*

VITRO

Fotoperíodo

Reguladores de crecimiento

Nitrógeno
 Concentración de sacarosa
 Temperatura
 Aireación y gelificación
EFECTO DEL GENOTIPO EN LA INDUCCIÓN FLORAL *IN VITRO*
 Conclusiones

INTRODUCCIÓN

El éxito reproductivo de una planta depende de que complete su ciclo hasta floración. Durante el proceso de inducción floral, a nivel de meristemo, ocurren una serie de eventos que afectarán el hábito de crecimiento vegetativo, incluyendo pérdida de la dominancia apical, alargamiento del tallo, cambios en la filotaxia y la forma de la hoja (Galoch *et al.*, 2002). El inicio de la floración está fuertemente regulado por cambios ambientales relacionados con factores estacionales tales como el fotoperíodo y la temperatura, y por el estado de desarrollo de la planta (Bernier *et al.*, 1993; Laurie, 2004).

La inducción floral involucra una serie de cambios profundos, pasando de estadios vegetativos (producción de tallos y hojas) a estadios reproductivos (producción de flores y semillas). La floración requiere de un alto grado de reservas por parte de la planta; por lo que se han generado mecanismos para asegurar que los procesos de inducción floral ocurran durante los periodos favorables para la floración. La forma en que las plantas regulan los procesos de inducción floral varía entre especies. Sin embargo, este proceso comúnmente involucra el uso de señales internas relacionadas con el fotoperíodo o cambios en temperatura (vernalización). La disponibilidad de agua, nutrientes o reguladores de crecimiento son otros de los factores de importancia para la inducción floral (Laurie, 2004).

Una sustancia debe cumplir con los siguientes requisitos para que se pueda confirmar su participación en la inducción floral: estímulos que conducen a la floración deben aumentar sus niveles endógenos en los meristemas, inhibidores de su biosíntesis deben bloquear la inducción floral y deben encontrarse pruebas que relacionen molecular o bioquímicamente a dicha sustancia con la inducción floral (King *et al.*, 2001).

Se ha relacionado a un grupo importante de genes con los procesos de inducción y regulación de la floración. Entre ellos se han propuesto varios relacionados con el control negativo (*LHY/CCA1*, *TOC1*) o positivo (*CO*, *PHYB*) de los ritmos circadianos que conllevan a la floración (Barak *et*

al., 2000; Hayama y Coupland, 2003). Durante los periodos inductivos, la floración es promovida por genes como *PHYA*, *FHA*, *CO*, *GI*, *LHY* o *FT*. Mientras que en periodos no inductivos, la floración puede inducirse por tocoferoles (Molina-Torres *et al.*, 1989) o mediante regulación hormonal (Roldán *et al.*, 1999).

Los primeros trabajos publicados sobre floración *in vitro* datan de 1933, cuando White logró, a partir del estímulo de meristemas preformados, la inducción floral en *Stellaria media* (Scorza, 1982). Posteriores eventos de floración *in vitro* han sido referidos a partir de la reorganización de estructuras preformadas (meristemas apicales, yemas y embriones somáticos), así como a partir de brotes adventicios obtenidos de callo proveniente de diversos tejidos (segmentos de tallo, raíces, hojas, cotiledones, pétalos, capas de células epidermales, protoplastos), entre otros (Scorza, 1982; Bernier *et al.*, 1993; Laurie, 2004).

En este trabajo se pretende hacer una recopilación, lo más exhaustiva posible, de los informes científicos relacionados con floración *in vitro* que se han publicados a partir de 1980. Las referencias anteriores a dicha fecha ya habían sido compiladas por Scorza (1982). Recientemente se publicó una revisión en el tema, pero limitada a plantas neófitas, que son aquellas plantas herbáceas que tienen órganos de almacenamiento bajo tierra, tales como bulbos, cormos, rizomas o tubérculos (Ziv y Naor, 2006).

FACTORES QUE AFECTAN LA FLORACIÓN *IN VITRO*

La floración *in vitro* puede ser inducida en diferentes estadios de desarrollo de las plantas *in vitro* mediante variaciones en factores químicos y físicos relacionados con el cultivo de tejidos. Las familias de plantas que presentan mayor número de referencias sobre floración *in vitro* son: *Poaceae*, *Rutaceae*, *Orchidaceae*, *Brassicaceae* y *Cucurbitaceae* (Tabla 1). Sin embargo, la gran variedad de familias en las que se ha informado dicho fenómeno parece indicar que no existe una relación directa entre el grupo taxonómico y la inducción de este proceso. La única relación que parece mantenerse es que fotoperíodos de 16 horas luz o mayores inducen la floración *in vitro* en plantas de día largo (*long day plants*, LDPs) en presencia de citoquininas en el medio de cultivo (Hillson y LaMotte, 1977; Scorza y Janick, 1980; Rajasekaran *et al.*, 1983; McDaniel *et al.*, 1991; Kachonpadungkitti *et al.*, 1992; Zhang y Leung, 2000; King *et al.*, 2001).

Tabla 1. Lista de especies y condiciones inductoras para la floración *in vitro*, a partir de 1980.

Especie (Familia)	Medio de Cultivo	Condiciones de Cultivo	Referencia
<i>Amaranthus caudatus</i> (Amaranthaceae)	Murashige y Skoog (1962) (MS) + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 0.1 mg.l ⁻¹ ácido naftalen acético (ANA) + 8 g.l ⁻¹ agar; pH 5.7	Fotoperiodo 16 horas (2.2 W m ⁻²); temperatura 26±1°C	Tisserat y Galletta (1988)
<i>Arabidopsis</i> sp. (Brassicaceae)	MS + 10 g l ⁻¹ sacarosa o glucosa + 0.5 g.l ⁻¹ ácido 2 (N-morfolino) etanosulfónico (MES) + 8 g.l ⁻¹ agar; pH 5.7	Oscuridad (5 semanas) – Fotoperiodo 12 horas (50 µE m ⁻² s ⁻¹); temperatura 24±2°C	Roldán et al. (1999)
<i>Arachis hypogaea</i> (Fabaceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 1.13 mg.l ⁻¹ benziladenina (BAP) + 6 g.l ⁻¹ agar; pH 5.7	Fotoperiodo 18 horas (3 000 lux); temperatura 27±1°C	Kachonpadungkiti et al. (1992)
<i>Arachis hypogaea</i> (Fabaceae)	½MS + vitaminas Gamborg + 100 mg.l ⁻¹ inositol + 0.5 mg.l ⁻¹ BAP + 30 g.l ⁻¹ sacarosa; pH 5.6 (medio de cultivo líquido)	Fotoperiodo 16 horas (60 µmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25±2°C	Tiwari y Tuli (2008)
<i>Bambusa arundinacea</i> (Poaceae)	MS + 20 g.l ⁻¹ sacarosa + 5% agua de coco (AC) + 2.22 µM BAP + 4 g.l ⁻¹ agar; pH 5.8	Fotoperiodo 24 horas (10 µmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 28±2°C	Joshi y Nadgauda (1997); Nadgauda et al. (1997)
<i>Bambusa edulis</i> (Poaceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 0.11 mg.l ⁻¹ tiazuron (TDZ), 5 mg.l ⁻¹ kinetina o 3.65 mg.l ⁻¹ BAP + 2.2 g.l ⁻¹ de Gelrite; pH 5.7	Fotoperiodo 16 horas (54 µmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 26±1°C	Lin et al. (2003)
<i>Boronia megastigma</i> (Rutaceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 8 mg.l ⁻¹ BAP + 11 g.l ⁻¹ agar; pH 5.8	Fotoperiodo 10 horas (16.5 µmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 15±1°C	Roberts et al. (1993)
<i>Bougainvillea</i> sp. cv. 'San Diego Red' (Nyctaginaceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ fructosa + 0.01 mg.l ⁻¹ ácido giberélico (AG ₃) + 6 g.l ⁻¹ agar; pH 5.7	Fotoperiodo 16 horas (20 µE m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25±2°C	Steffen et al. (1988)
<i>Brassica oleracea</i> (Brassicaceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 3 mg.l ⁻¹ ácido indol acético (AIA) + 5 mg.l ⁻¹ kinetina + 3 g.l ⁻¹ de Phytagar; pH 5.7	Fotoperiodo 16 horas (3 000 lux); temperatura 26±2°C	Kumar et al. (1995)
<i>Capsicum frutescens</i> (Solanaceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 40 µM nitrato de plata (ó 30 µM cloruro de cobalto) + 8 g.l ⁻¹ agar; pH 5.8	Fotoperiodo 16 horas (4.41 J m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25±2°C	Sharma et al. (2008)
<i>Ceropegia bulbosa</i> (Asclepiadaceae)	Gamborg et al. (1968) + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 0.5 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ AG ₃ + 8 g.l ⁻¹ agar; pH 5.7	Fotoperiodo 16 horas (3 000 lux); temperatura 25±2°C	Britto et al. (2003)
<i>Ceropegia</i> spp. (Asclepiadaceae)	MS + 60 g.l ⁻¹ sacarosa + 26.6 µM BAP + 8 g.l ⁻¹ agar; pH 5.8	Fotoperiodo 16 horas (40 µmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25±2°C	Nair et al. (2007)

Tabla 1. (Continuación)

Especie (Familia)	Medio de Cultivo	Condiciones de Cultivo	Referencia
<i>Cichorium intybus</i> (Asteraceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 8.5 mg.l ⁻¹ AgNO ₃ + 2 mg.l ⁻¹ 2-isopentiladenina (2-iP) + 0.5 mg.l ⁻¹ AG ₃ + 8 g.l ⁻¹ putrescina (Put) + 8 g.l ⁻¹ agar; pH 5.8	Fotoperíodo 16 horas (50 μ E m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25 \pm 2°C	Bais <i>et al.</i> (2001)
<i>Citrus limon</i> (Rutaceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 0.1 mg.l ⁻¹ ANA + 8 g.l ⁻¹ agar; pH 5.7	Fotoperíodo 16 horas (2.2 W m ⁻²); temperatura 20 \pm 1°C	Tisserat <i>et al.</i> (1990)
<i>Citrus nobilis</i> x <i>C. deliciosa</i> (Rutaceae)	MS + 40 g.l ⁻¹ sacarosa + 2 mg.l ⁻¹ kinetina o BAP + 8 g.l ⁻¹ agar; pH 5.6	Fotoperíodo 12 horas (40 μ mol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25 \pm 2°C	Singh <i>et al.</i> (2006)
<i>Citrus unshiu</i> (Rutaceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 1 mg.l ⁻¹ BAP + 12 g.l ⁻¹ agar; pH 5.6	Fotoperíodo 16 horas (30 μ mol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 15 \pm 2°C (15 días), luego 22 \pm 2°C	García-Luis <i>et al.</i> (1992)
<i>Cucumis sativus</i> (Cucurbitaceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 0.11 mg.l ⁻¹ BAP + 0.33 mg.l ⁻¹ ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) + 0.1 g.l ⁻¹ caseína hidrolizada (CasHid) + 8 g.l ⁻¹ agar; pH 5.7	Fotoperíodo 24 horas (25 W m ⁻²); temperatura 27 \pm 2°C	Rajasekaran <i>et al.</i> (1983)
<i>Cymbidium ensifolium</i> (Orchidaceae)	50% MS + 20 g.l ⁻¹ sacarosa + 0.5 mg.l ⁻¹ niacina + 1 g.l ⁻¹ peptona + 0.05 mg.l ⁻¹ ANA + 2 mg.l ⁻¹ 2iP o TDZ + 2.2 g.l ⁻¹ Gelrite; pH 5.2	Fotoperíodo 16 horas (10 μ mol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25 \pm 2°C	Chang y Chang (2003)
<i>Cymbidium niveo-marginatum</i> (Orchidaceae)	MS + 40 g.l ⁻¹ sacarosa + 10 mg.l ⁻¹ BAP + 1/20 de la concentración de N + 5 veces la concentración de P + toda de raíces + 2.5 g.l ⁻¹ gelrite	Fotoperíodo 16 horas (50 μ mol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25-26°C	Kostenyuk <i>et al.</i> (1999)
<i>Dendrobium Chao Praya Smile</i> (Orchidaceae)	Knudson C + 20 g.l ⁻¹ sacarosa + 15% AC + 11.1 μ M BAP 3 g.l ⁻¹ gelrite; pH 5.3	Fotoperíodo 16 horas (40 μ mol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25 \pm 2°C	Hee <i>et al.</i> (2007)
<i>Dendrobium Madame Thong-In</i> (Orchidaceae)	Knudson C + 20 g.l ⁻¹ sacarosa + 4.4 μ M BAP + 15% AC + 3 g.l ⁻¹ gelrite; pH 5.3	Fotoperíodo 16 horas (35 μ mol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 26 \pm 2°C	Sim <i>et al.</i> (2007, 2008)
<i>Dendrobium Second Love</i> (Orchidaceae)	Macronutrientes modificados de Vacin y Went (1949) + micronutrientes MS + 20 g.l ⁻¹ sacarosa + 1.8 μ M TDZ + 2 g.l ⁻¹ Phytigel; pH 5.85	Fotoperíodo 16 horas (35-45 μ mol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 26 \pm 1°C	Ferreira <i>et al.</i> (2006)
<i>Dendrobium Sonia 17</i> (Orchidaceae)	½ MS + vitaminas de Gamborg + 20 μ M BAP (no se indica concentración ni tipo de azúcar ni de gelificante)	Fotoperíodo 16 horas (25 μ mol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25 \pm 2°C	Tee <i>et al.</i> (2008)

Tabla 1. (Continuación)

Especie (Familia)	Medio de Cultivo	Condiciones de Cultivo	Referencia
<i>Dendrocalamus giganteus</i> (Poaceae)	MS + 20 g.l ⁻¹ sacarosa + 80 ml.l ⁻¹ AC + 6 mg.l ⁻¹ BAP + 0.1 mg.l ⁻¹ kinetina + 2.2 g.l ⁻¹ Gelrite; pH 5.6	Fotoperiodo y temperatura no indicadas	Ramanayake et al (2001)
<i>Dendrocalamus hamiltonii</i> (Poaceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 5 mg.l ⁻¹ BAP (solo las primeras 4 semanas) + 7 g.l ⁻¹ agar, pH 5.7	Fotoperiodo 16 horas (140 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 28±2°C	Chambers et al. (1991)
<i>Dendrocalamus latiflorus</i> (Poaceae)	MS + 1 mg.l ⁻¹ TDZ + sacarosa (no indican cantidad) + 2.2 g.l ⁻¹ gelrite; pH 5.7	Fotoperiodo 16 horas (54 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 26°C	Lin et al. (2007)
<i>Dianthus caryophyllus</i> cv. German Red (Caryophyllaceae)	MS + 100 mg.l ⁻¹ inositol + 100 mg.l ⁻¹ arginina + 100 mg.l ⁻¹ alanina + 100 mg.l ⁻¹ ácido ascórbico + 8.9 μM BAP + 2.7 μM ANA + 7.5 g.l ⁻¹ agar (no indican cantidad de sacarosa ni valor del pH)	Fotoperiodo 16 horas (40-50 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25±1°C	Sankhla et al. (1994)
<i>Fagopyrum esculentum</i> (Polygonaceae)	½ MS con nitrato como única fuente de N + 50 g.l ⁻¹ sacarosa + 0.02 mg.l ⁻¹ kinetina + 10 g.l ⁻¹ agar, pH 5.7	Fotoperiodo 8 horas (12 semanas) – 16 horas (35 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 27±2°C	Kachonpadungkiti et al. (2001)
<i>Fortunella hindsii</i> (Rutaceae)	½ MS + 50 g.l ⁻¹ sacarosa + 0.01 mg.l ⁻¹ BAP + 3 g.l ⁻¹ Gelrite; pH 5.7	Fotoperiodo 16 horas (35.3 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25±1°C	Jumin y Nito (1996)
<i>Gentiana triflora</i> (Gentianaceae)	WPM (Lloyd y McCown 1980) con vitaminas B ₅ (Gamborg et al., 1968) + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 0.45 mg.l ⁻¹ kinetina + 7.5 g.l ⁻¹ agar; pH 5.8	Fotoperiodo 16 horas (60 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 22±2°C	Zhang y Leung (2000)
<i>Glycine max</i> (Fabaceae)	1/5 MS (sin NH ₄ NO ₃) + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 8 g.l ⁻¹ agar, pH 5.8	Fotoperiodo 8 horas (110 μE m ⁻² s ⁻¹); temperatura 23±2°C	Dickens y van Staden (1985)
<i>Kalanchoe blossfeldiana</i> (Crassulaceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 9 g.l ⁻¹ agar; pH 5.8	Fotoperiodo 8 horas (110 μE m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25±2°C	Dickens y van Staden (1988)
<i>Kniphofia leucocephala</i> (Asphodelaceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 4.5 mg.l ⁻¹ BAP + 2 g.l ⁻¹ Gelrite; pH 5.8	Fotoperiodo 16 horas (12.6 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25±2°C	Taylor et al. (2005)
<i>Kniphofia leucocephala</i> (Asphodelaceae)	MS + 60 g.l ⁻¹ sacarosa + 2.0 mg.l ⁻¹ BAP + 2 g.l ⁻¹ Gelrite; pH 5.8	Fotoperiodo 16 horas (12.6 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25±2°C	Taylor et al. (2007)
<i>Lemna</i> sp. (Lemnaceae)	Pirson y Seidel (1950) con 7.3 mg.l ⁻¹ Fe-EDTA en reemplazo de FeSO ₄ + 20 g.l ⁻¹ sacarosa + 1 mg.l ⁻¹ kinetina + 0.22 μM/l – Put, espermidina (Spd) o espermina (Spm) + 2.5 g.l ⁻¹ agar; pH 5.5	Fotoperiodo 8 – 12 horas (4 500 lux); temperatura 24±2°C	Mader (2004)

Tabla 1. (Continuación)

Especie (Familia)	Medio de Cultivo	Condiciones de Cultivo	Referencia
<i>Leptinella nana</i> (Compositae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 8 g.l ⁻¹ agar; pH 5.7	Fotoperíodo 24 horas (70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); temperatura 22 \pm 1°C	Carson y Leung (1994)
<i>Lolium temulentum</i> (Poaceae)	MS + 50 g.l ⁻¹ sacarosa + 0.35 mg.l ⁻¹ AG ₃ + 0.1 mg.l ⁻¹ kinetina + 7 g.l ⁻¹ agar; pH 5.6	Fotoperíodo 24 horas (3 días) – 8 horas (55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); temperatura 25 \pm 2°C	McDaniel <i>et al.</i> (1991)
<i>Lycopersicon esculentum</i> (Solanaceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 2 mg.l ⁻¹ BAP + 8 g.l ⁻¹ agar; pH 5.8	Fotoperíodo 16 horas (39.3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); temperatura 25 \pm 2°C	Sheeja y Mandal (2003)
<i>Manihot esculenta</i> (Euphorbiaceae)	Medio propio + 0.5 uM AIA + 5 uM BAP + 0.5 uM AG ₃	Fotoperíodo 16 horas (4000 lux); temperatura 27–30°C	Tang <i>et al.</i> (1983)
<i>Momordica charantia</i> (Cucurbitaceae)	MS + 0.003 mg.l ⁻¹ Fe ²⁺ + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 0.45 mg.l ⁻¹ kinetina o BAP + 8 g.l ⁻¹ agar; pH 6	Fotoperíodo 12 horas (50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); temperatura 25 \pm 2°C	Wang <i>et al.</i> (2001)
<i>Murraya paniculata</i> (Rutaceae)	Murashige y Tucker (1969) + 50 g.l ⁻¹ sacarosa + 0.01 mg.l ⁻¹ BAP + 3 g.l ⁻¹ Gelrite; pH 5.7	Fotoperíodo 16 horas (52.9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); temperatura 25 \pm 1°C	Jumin y Ahmad (1999)
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun (Solanaceae)	MS + 125 mM sacarosa + 1 uM AIA + 1 uM BAP + 10 g.l ⁻¹ agar (no se indica el pH del medio)	No se indica	Peeters <i>et al.</i> (1991)
<i>Olea europaea</i> (Oleaceae)	½ MS + vitaminas OM (Rugini 1984) + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 10 mg.l ⁻¹ AG ₃ + 8 g.l ⁻¹ agar; pH 5.7	Fotoperíodo 16 horas (3 000 lux); temperatura 24 \pm 2°C	Chaari-Rkhis <i>et al.</i> (2006)
<i>Oncidium varicosum</i> (Orchidaceae)	Medio Knudson (1946) con 27.8 mg.l ⁻¹ Fe-EDTA + 10 g.l ⁻¹ sacarosa + 0.5 mg.l ⁻¹ ANA + 60 g.l ⁻¹ pulpa de banano + 1 g.l ⁻¹ carbón activado (CAct) + 8 g.l ⁻¹ agar; pH 5.7	Fotoperíodo 16 horas (500 lux); temperatura 25 \pm 1°C	Kerbauy (1984)
<i>Orychophragmus violaceus</i> (Brassicaceae)	½ MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 2.5 mg.l ⁻¹ zeatina + 2 mg.l ⁻¹ AG ₃ + 7 g.l ⁻¹ agar; pH 5.7	Fotoperíodo 16 horas (17.47 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); temperatura 7 \pm 2°C (14 días), luego 20 \pm 2°C	Luo <i>et al.</i> (2000)
<i>Panax ginseng</i> (Araliaceae)	Gamborg <i>et al.</i> (1968) + 20 g.l ⁻¹ sacarosa + 1 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ AG ₃ + 7 g.l ⁻¹ agar; pH 5.7	Fotoperíodo 16 horas (1 500 lux); temperatura 26 \pm 1°C	Chang y Hsing (1980)
<i>Passiflora suberosa</i> (Passifloraceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 0.1 mg.l ⁻¹ BAP + 10 g.l ⁻¹ bad-o-agar; pH 5.7	Fotoperíodo 16 horas (2 000 lux); temperatura 26 \pm 1°C	Scorza y Janick (1980)
<i>Pentanema indicum</i> (Asteraceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 2 mg.l ⁻¹ ácido indolbutírico (AIB) + 8 g.l ⁻¹ agar; pH 5.7	Fotoperíodo 16 horas (3 000 lux); temperatura 25 \pm 2°C	Sivanesan y Jeong (2007)

Tabla 1. (Continuación)

Especie (Familia)	Medio de Cultivo	Condiciones de Cultivo	Referencia
<i>Perilla crispa</i> (Lamiaceae)	White con 80 mg.l ⁻¹ KNO ₃ como fuente de N + 20 g.l ⁻¹ sacarosa + 7 g.l ⁻¹ agar; pH 5.8	Fotoperíodo 24 horas (2 000 lux); temperatura 25±1°C	Wada y Totsuka (1982)
<i>Phalaenopsis</i> sp. (Orchidaceae)	3.5 g.l ⁻¹ Hyponex + 2 g.l ⁻¹ peptona + 25 g.l ⁻¹ sacarosa + 5 mg.l ⁻¹ BAP + 10 g.l ⁻¹ agar; pH 5.6	Fotoperíodo 12 horas (28.5 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25±2°C	Duan y Yazawa (1995)
<i>Pharbitis nil</i> (Convolvaceae)	4/5 MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 0.02 mg.l ⁻¹ BAP + 0.03 mg.l ⁻¹ AG ₃ + 2.5 g.l ⁻¹ Gelrite; pH 5.7	Fotoperíodo 12 horas (18.3 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25±2°C	Galoch <i>et al.</i> (2002)
<i>Phyllanthus niruri</i> (Euphorbiaceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 0.5 mg.l ⁻¹ GA ₃ + 7.5 g.l ⁻¹ agar; pH 5.7	Fotoperíodo 24 horas (44±9 μE m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25±2°C	Liang y Keng (2006)
<i>Pisum sativum</i> (Fabaceae)	MS (1/2x NH ₄ NO ₃) + vitaminas B ₅ + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 1 mg.l ⁻¹ AG ₃ + 0.5 mg.l ⁻¹ AIB + 7 g.l ⁻¹ agar; pH 5.8	Fotoperíodo 16 horas (30 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25±2°C	Franklin <i>et al.</i> (2000)
<i>Psychomorphis pusilla</i> (Orchidaceae)	Vacin-Went con 27.8 mg.l ⁻¹ Fe-EDTA y 22.3 mg.l ⁻¹ MnSO ₄ ·4H ₂ O + 20 g.l ⁻¹ sacarosa + 60 g.l ⁻¹ pulpa de banano + 1 g.l ⁻¹ carbón activado (CAct) + 6 g.l ⁻¹ agar; pH 5.8	Fotoperíodo 12 – 16 horas (30 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 27±1°C	Vaz <i>et al.</i> (2004)
<i>Rauwolfia tetraphylla</i> (Apocynaceae)	MS + vitaminas B ₅ + 30 g.l ⁻¹ sacarosa 4.44 μM BAP + 4.3 μM AG ₃ + 8 g.l ⁻¹ agar; pH 5.7	Fotoperíodo 16 horas (1 500 lux); temperatura 25±2°C	Anitha y Kumaní (2006)
<i>Rosa</i> sp. (Rosaceae)	MS sin NH ₄ NO ₃ + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 400 mg.l ⁻¹ mio-inositol + 0.1 mg.l ⁻¹ ANA + 0.5 mg.l ⁻¹ zeatina o TDZ + 3 g.l ⁻¹ Phytigel; pH 5.8	Fotoperíodo 16 horas (26 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25±2°C	Wang <i>et al.</i> (2002)
<i>Rosa hybrida</i> cv. 'First Prize' (Rosaceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 3 mg.l ⁻¹ BAP + 0.1 mg.l ⁻¹ ANA (nose indicó tipo ni concentración de gelificante)	Fotoperíodo 10 horas (45 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25±2°C	Vu <i>et al.</i> (2006)
<i>Saccharum officinarum</i> (Poaceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 100 mg.l ⁻¹ polivinilpirrolidona (PVP) + 3 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 100 cc/l AC + 40 mg.l ⁻¹ prolina + 1.6 g.l ⁻¹ Gelrite; pH 5.7	Oscuridad (15 días), luego fotoperíodo de 6 horas (40 μE m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25±2°C	Virupakshi <i>et al.</i> (2002)
<i>Salvia africana-lutea</i> (Lamiaceae)	MS + 100 mg.l ⁻¹ inositol + 2.5 μM AIB + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 10 g.l ⁻¹ agar; pH 5.8	Fotoperíodo 24 horas (50 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 22-24°C	Makunga y van Staden (2008)
<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Umbelliferae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 0.34 – 1.36 μM paclobutrazol ó 1 – 4 μM etephon + 6 g.l ⁻¹ agar; pH 5.8	Fotoperíodo 14 horas (80 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25±2°C	Qiao <i>et al.</i> (2009)

Tabla 1. (Continuación)

Especie (Familia)	Medio de Cultivo	Condiciones de Cultivo	Referencia
<i>Solanum tuberosum</i> (Solanaceae)	MS con vitaminas B ₅ + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 0.75 g.l ⁻¹ MgCl ₂ + 0.5 mg.l ⁻¹ kinetina + 0.1 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 1.6 g.l ⁻¹ Gelrite; pH 5.7	Fotoperíodo 16 horas (16 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 27±2°C	Al-Wareh et al. (1989)
<i>Spathiphyllum canniifolium</i> cv. Sunny Sails (Araceae)	MS + 60 g.l ⁻¹ sacarosa + 10 mg.l ⁻¹ GA ₃ + 2 g.l ⁻¹ gelrite; pH 5.7 (biorreactor)	Fotoperíodo 16 horas (35 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25±2°C	Dewir et al. (2007, 2008)
<i>Spathoglottis plicata</i> (Orchidaceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 2 mg.l ⁻¹ kinetina + 0.5 mg.l ⁻¹ ANA + 100 mg.l ⁻¹ CasHd + 10% AC + 7 g.l ⁻¹ agar; pH 5.7	Fotoperíodo 16 horas (2 000 lux); temperatura 25±2°C	Murthy et al. (2006)
<i>Spinacia oleracea</i> (Chenopodiaceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 2 mg.l ⁻¹ kinetina + 0.01 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 1 mg.l ⁻¹ AG ₃ + 8 g.l ⁻¹ agar; pH 5.8	Fotoperíodo 14 horas (84 días) – 10 horas (65 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 22±3°C	Al-Khayri et al. (1991)
<i>Streptocarpus nobilis</i> (Gesneriaceae)	MS con 40 mg.l ⁻¹ 330-Fe + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 3.38 mg.l ⁻¹ BAP + 6 g.l ⁻¹ agar; pH 5.8	Fotoperíodo 8 horas (35 μE m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25±1°C	Simmonds (1982)
<i>Streptocarpus nobilis</i> (Gesneriaceae)	Macroelementos de Knop + microelementos y vitaminas de Nitsch y Nitsch (1965) + 1.5 g.l ⁻¹ adenina + 20 g.l ⁻¹ sacarosa + 0.1 mg.l ⁻¹ AIA + 0.35 mg.l ⁻¹ BAP + 8 g.l ⁻¹ agar; pH 5.5	Fotoperíodo 8 horas (5 000 lux); temperatura 22°C (oscuridad) – 28°C (luz)	Handro (1983)
<i>Torenia</i> sp. (Linderniaceae)	MS con 330 mg.l ⁻¹ NH ₄ NO ₃ + 60 g.l ⁻¹ sacarosa + 6 g.l ⁻¹ agar; pH 5.7	Fotoperíodo 8 horas (2 000 lux); temperatura 25±2°C	Tanimoto y Harada (1981)
<i>Vernonia cinerea</i> (Asteraceae)	MS + 2 g.l ⁻¹ inositol + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 8 g.l ⁻¹ agar (sin reguladores de crecimiento); pH 5.8	Fotoperíodo 16 horas (25 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 25±2°C	Maheshwari y Kumar (2006)
<i>Vigna aconitifolia</i> (Fabaceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 1-3 μM ABA (o 600 μM prolina) + 8 g.l ⁻¹ agar; pH	Fotoperíodo 14 horas (68 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 27±0.5°C	Saxena et al. (2008)
<i>Withania somnifera</i> (Solanaceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 2 mg.l ⁻¹ kinetina + 0.1 mg.l ⁻¹ AIA + 8 g.l ⁻¹ agar; pH 5.8	Fotoperíodo 20 horas (2 000 lux); temperatura 26±2°C; humedad relativa 60-70%	Saritha y Naidu (2007)
<i>Zantedeschia</i> sp. (Araceae)	MS + 30 g.l ⁻¹ sacarosa + 20 mg.l ⁻¹ AG ₃ + 6.5 g.l ⁻¹ agar; pH 5.7	Fotoperíodo 16 horas (75 μmol m ⁻² s ⁻¹); temperatura 22±1°C	Naor et al. (2004)

Fotoperíodo

La percepción del fotoperíodo requiere de la participación de fotorreceptores. Entre los más importantes se encuentran los fitocromos, los cuales pueden distinguir entre luz y oscuridad, así como la duración de estas fases (Reid *et al.*, 2004). Períodos de oscuridad continua estimulan un aumento en la biosíntesis de diversas giberelinas y su sensibilidad por parte de las células (Reed *et al.*, 1996). La percepción de longitudes de onda correspondientes al espectro rojo e infrarrojo por parte de las hojas inductoras (generalmente las más cercanas a la yema) parecen activar una señal de estímulo para la inducción floral. Esta señal es trasladada en un lapso de 16 a 24 horas posterior al inicio de la exposición al período de luz correcto, sin verse afectada por la intensidad lumínica (Perilleux *et al.*, 1994).

La sensibilidad de las plantas *in vitro* hacia el fotoperíodo varía durante su desarrollo. En algunos casos las plantas presentan un aumento y en otros una disminución en la sensibilidad conforme avanzan hacia la madurez. Estos cambios en la capacidad de percepción de las plantas hacia la luz ha sido relacionada, no con los cambios en la susceptibilidad de los meristemos al estímulo de inducción floral, sino con los procesos inductivos de dicho estímulo en las hojas (Simmonds, 1982). Se han encontrado plantas de día corto (*short day plants*, SDPs), plantas de día corto desplazado (*displaced short day plants*, DSDPs) y LDPs que responden al mismo ritmo circadiano de aproximadamente 24 horas *in vitro*. La inducción floral en el cultivo de tejidos parece estar fuertemente influenciada por este modelo en muchas plantas sensibles al fotoperíodo (PSF) (Kachonpadungkitti *et al.*, 2001). Se ha hecho referencia al papel del fotoperíodo como un factor de gran importancia para la floración *in vitro* en diferentes especies (Tabla 2).

Reguladores de crecimiento

En forma general, los reguladores del crecimiento y las poliaminas son considerados como las principales señales de estímulo para la inducción floral. Su relación, tanto a nivel de la inducción como de la morfogénesis de la flor, indica que su acción es multifactorial (Bernier *et al.*, 1993; Perilleux y Bernier, 1997). A nivel fisiológico, citoquininas, auxinas y giberelinas han mostrado tener un efecto importante en la inducción floral en varias especies de plantas (Metzger, 1987). Durante la inducción floral en *Lolium*, una LDP, los niveles de GA₅ aumentan inicialmente, seguido varios días después, por un incremento en la concentración de GA₁, AG₃, GA₄ y GA₆ (King *et al.*, 2001). Los cambios para que los meristemos vegetativos pasen a su estadio reproductivo involucran la redistribución de fitohormonas endógenas y la pérdida de la dominancia apical. El efecto de las fitohormonas durante la inducción floral puede estar relacionado con cambios en el crecimiento y desarrollo de los meristemos en estado vegetativo, que pasan a un estado reproductivo (Galoch *et al.*, 2002).

In vitro, las citoquininas pueden inducir el desarrollo floral a partir de varios órganos (Tabla 3). Tiazurón (TDZ), 2-isopentiladenina (2iP) y benciladenina (BAP) han mostrado tener un fuerte efecto inductor en *Cymbidium ensifolium* (Chang y Chang, 2003) y *Bambusa edulis* (Lin *et al.*, 2004). Sin embargo, no todas las citoquininas muestran un efecto positivo en la floración. Altas concentraciones de varias citoquininas (zeatina, kinetina, BAP y 2iP) pueden inhibir la inducción floral y ocasionar un efecto en la brotación de yemas vegetativas, como se ha observado en *Torenia* sp. (Tanimoto y Harada, 1981), *Fagopyrum esculentum* (Kachonpadungkitti *et al.*, 2001), *Pharbitis nil* (Galoch *et al.*, 2002) y *Kniphofia leucocephala* (Taylor *et al.*, 2005).

Tabla 2. Referencias en las cuales se ha observado efecto del fotoperíodo en la inducción floral *in vitro*.

Especie	Fotoperíodo	Referencia
<i>Arabidopsis</i> sp.	Oscuridad	Roldán <i>et al.</i> (1999)
<i>Citrus nobilis</i> x <i>C. deliciosa</i>	SDP	Singh <i>et al.</i> (2006)
<i>Cucumis sativus</i> cv. 'Marketmore-76'	Luz constante	Tisserat y Galletta (1993)
<i>Gentiana triflora</i>	LDP	Zhang y Leung (2002)
<i>Lemna</i> sp.	DSDP	Mader (2004)
<i>Leptinella nana</i>	Luz constante	Carson y Leung (1994)
<i>Lolium temulentum</i>	Luz constante	McDaniel <i>et al.</i> (1991)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	LDP	Sheeja y Mandal (2003)
<i>Nicotiana tabacum</i>	LDP	Hills on y LaMotte (1977)
<i>Psycmorchis pusilla</i>	LDP	Vaz <i>et al.</i> (2004)
<i>Solanum tuberosum</i>	LDP	Al-Wareh <i>et al.</i> (1989)
<i>Spinacia oleracea</i>	LDP	Al-Khayri <i>et al.</i> (1991)
<i>Streptocarpus nobilis</i>	SDP	Simmonds (1982)
<i>Streptocarpus nobilis</i>	SDP	Handro (1983)

Tabla 3. Trabajos en los cuales se relacionan las citoquininas con la inducción floral *in vitro*.

Especie	Citoquinina(s)	Explanje inicial	Referencia
<i>Amaranthus caudatus</i>	BAP	Semilla	Tis seraf y Galleta (1988)
<i>Arachis hypogaea</i>	BAP	Semillas	Kachonpadungkitti <i>et al.</i> (1992)
<i>Bambusa arundinacea</i>	BAP	Nudos	Nadgauda <i>et al.</i> (1990)
<i>Bambusa edulis</i>	BAP, kinetina, TDZ	Nudos	Lin y Chang (1998); Lin <i>et al.</i> (2003, 2004)
<i>Begonia francois</i>	BAP, kinetina	Segmentos de tallo	Berghoef y Bruinsma (1979)
<i>Begonia teuscheri</i> x <i>B. coccinea</i>	BAP	Hojas y pedúnculo floral	Ringe y Nitsch (1968)
<i>Boronia megastigma</i>	BAP	Segmentos de tallo	Roberts <i>et al.</i> (1993)
<i>Brassica oleracea</i>	kinetina	Yemas	Kumar <i>et al.</i> (1995)
<i>Citrus nobilis</i> x <i>C. deliciosa</i>	BAP, kinetina	Óvulos fértiles	Singh <i>et al.</i> (2006)
<i>Cymbidium ensifolium</i>	BAP, 2iP, TDZ	Segmentos de escapo floral	Wang (1988)
<i>Dendrocalamus brandisii</i>	BAP	Nudos	Nadgauda <i>et al.</i> (1990)
<i>Dendrocalamus giganteus</i>	BAP, TDZ	Yemas laterales	Ramanayake <i>et al.</i> (2001)
<i>Dendrocalamus giganteus</i> , <i>Dendrocalamus strictus</i> , <i>Bambusa vulgaris</i>	BAP	Nudos	Rout y Das (1994)
<i>Dendrocalamus hamiltonii</i>	BAP	Nudos	Chambers <i>et al.</i> (1991)
<i>Fagopyrum esculentum</i>	kinetina	Semilla	Kachonpadungkitti <i>et al.</i> (2001)
<i>Fortunella hindsii</i>	BAP, kinetina	Entrenudos de tallo y yemas	Jumin y Nito (1996)
<i>Gentiana triflora</i>	BAP, kinetina	Yemas laterales	Zhang y Leung (2000, 2002)
<i>Kalanchoe blotsfeldiana</i>	BAP	Nudos	Dickens y van Staden (1990)
<i>Kniphofia leucocephala</i>	BAP, 2iP, zeatina	Yemas laterales	Taylor <i>et al.</i> (2005)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	BAP	Callo de hoja y tallo	Sheeja y Mandal (2003)
<i>Momordica charantia</i>	BAP, kinetina	Ápices	Wang <i>et al.</i> (2001)
<i>Murraya paniculata</i>	BAP	Yemas laterales	Jumin y Ahmad (1999)
<i>Nicotiana tabacum</i>	kinetina	Segmentos de tallo	Hillson y LaMotte (1977)
<i>Orychophragmus violaceus</i>	zeatina	Semilla	Luo <i>et al.</i> (2000)
<i>Passiflora suberosa</i>	BAP	Hojas, segmentos de tallo y zarcillos	Scorza y Janick (1980)
<i>Phalaenopsis</i> sp.	BAP	Estructuras protocómicas	Duan y Yazawa (1995)
<i>Rosa</i> sp.	BAP, TDZ, zeatina	Ápices	Wang <i>et al.</i> (2002)
<i>Streptocarpus nobilis</i>	BAP	Hojas	Simmonds (1982)
<i>Torenia</i> sp.	zeatina	Segmentos de tallo	Tanimoto y Harada (1981)

Hay indicios de que las citoquininas y giberelinas son exportadas desde las hojas hacia los meristemos durante la inducción floral *in vitro* en *Mormodica charantia* (Prakash, 1977), *Panax ginseng* (Chang y Hsing, 1980), *Passiflora suberosa* (Scorza y Janick, 1980), *Arabidopsis* sp. (Roldán *et al.*, 1999) y *Orychophragmus violaceus* (Luo *et al.*, 2000). Tanto citoquininas como giberelinas pueden tener un efecto inductor en fotoperiodos de baja intensidad lumínica (por debajo de los 34 mM m⁻² s⁻¹) en *O. violaceus* (Luo *et al.*, 2000) y *P. nil* (Galoch *et al.*, 2002). Se ha informado que altas concentraciones de citoquininas o giberelinas (superiores a 5 mg l⁻¹) promueven la inducción floral pero, a la vez, han inhibido el desarrollo de estructuras florales en *P. nil* (Galoch *et al.*, 2002).

Las giberelinas son fundamentales en el proceso de inducción floral *in vitro* en condiciones de fotoperiodicidad no inductiva tal como se ha observado en *Bougainvillea* sp. cv. 'San Diego Red' (Steffen *et al.*, 1988), *Kalanchoe blossfeldiana* (Dickens y van Staden, 1990), *Arabidopsis* sp. (Roldán *et al.*, 1999) y *Zantedeschia* sp. (Naor *et al.*, 2004). Además, el efecto de las giberelinas aparenta ser sinérgico con el efecto inductor causado por el fotoperíodo en *P. nil* (Galoch *et al.*, 2002) y en *Olea europaea* (Chaari-Rkhis *et al.*, 2006).

Las poliaminas putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) han sido relacionadas con diferentes procesos fisiológicos de importancia para el desarrollo de la planta, uno de ellos la inducción floral. Una relación Spd/Spm alta estimula la floración *in vitro* en varias especies (Bais *et al.*, 2001). Los efectos de la Put suelen ser menores y más variables que los de Spd y Spm. Esto sugiere que Put no actúa *per se*, sino probablemente como precursor de la Spd (Mader, 2004).

La relación poliaminas/etileno parece estar involucrada en la inducción floral *in vitro* de forma contrastante en LDPs y SDPs. En LDPs las concentraciones endógenas de etileno tienden a ser inferiores a las de poliaminas y el caso contrario se da en las SDPs (Bais *et al.*, 2001; Mader, 2004). La Put puede inducir la conversión de S-adenosil-L-metionina (SAM) en Spd en *Cichorium intybus*, lo cual reduce la síntesis de etileno (Bais *et al.*, 2001). En *Lemna* sp., la relación a favor del etileno permite que la enzima S-adenosil-L-metionina descarboxilasa (SAMDC) catalice la síntesis de etileno a partir de SAM (Mader, 2004).

Reducciones en las emisiones de etileno pueden ser resultado directo de la aplicación exógena de poliaminas. Las poliaminas (Put, Spd y Spm) pueden actuar como inhibidores de SAMDC; mientras que el etileno puede bloquear el metabolismo de las poliaminas en las plantas, reprimiendo la inducción floral (Bais *et al.*, 2001). El AgNO₃ ha mostrado tener

un efecto positivo en la inducción floral en *C. intybus*, aparentemente porque los iones Ag²⁺ reducen la capacidad de los receptores de membrana para detectar el etileno, lo que inhibe su acción. Esto resulta en una autoinhibición en el proceso de biosíntesis del etileno, generando que la SAM quede disponible para la síntesis de poliaminas (Bais *et al.*, 2001).

Se ha observado inhibición de la inducción floral *in vitro* mediante la adición de auxinas en *Plumbago indica* (Nitsch y Nitsch, 1965), *Streptocarpus nobilis* (Simmonds, 1982), *P. nil* (Galoch *et al.*, 2002) y *B. edulis* (Lin *et al.*, 2003). Las auxinas han mostrado ser un poderoso inhibidor de la floración *in vitro* tanto en SDPs como en LDPs. En LDPs se ha observado que la inducción floral se da como resultado de la reducción de la concentración de auxinas en el meristemo. Esto ocasiona un cambio en la relación auxina/citoquinina a favor de las citoquininas lo cual puede llevar al proceso de floración. Hay dos posibles explicaciones para este cambio: que algunas auxinas actúen como inhibidores directos de la floración o que las auxinas desvíen los nutrientes necesarios para que ocurra la inducción floral (Dickens y van Staden, 1990). No obstante, la adición de auxinas exógenas parece ser necesaria durante los primeros estadios del desarrollo floral en *Nicotiana tabacum* (Hillson y LaMotte, 1977), *Begonia franconis* (Berghoef y Bruinsma, 1979), *Torenia* sp. (Tanimoto y Harada, 1981), *Solanum tuberosum* (Al-Wareh *et al.*, 1989), *Citrus limon* (Tisserat *et al.*, 1990), *Brassica oleracea* (Kumar *et al.*, 1995), *Rosa* sp. (Wang *et al.*, 2002) y *B. edulis* (Lin *et al.*, 2003).

Aunque generalmente se ha relacionado al ácido abscísico (ABA) con inhibición de la inducción floral (Bernier y Périlleux 2005), en *K. blossfeldiana* la presencia de concentraciones bajas de ABA es indispensable para la floración *in vitro*. Esto debido probablemente al efecto inhibitorio del ABA sobre el desarrollo vegetativo (Dickens y van Staden, 1990).

Nitrógeno

La relación carbono/nitrógeno juega un papel importante en la inducción floral *in vitro*. Concentraciones altas de nitrógeno se han relacionado con el desarrollo vegetativo de explantes de *S. nobilis* (Simmonds, 1982) y del cruce *Doritis pulcherrima* x *Kingiella philippiensis* (Duan y Yazawa, 1994). De la misma forma, hay indicios de que entre mayor sea la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo, menor es el porcentaje de explantes que desarrollan flores en *Torenia* sp. (Tanimoto y Harada, 1981), *S. nobilis* (Simmonds, 1982), *O. violaceus* (Luo *et al.*, 2000) y *F. esculentum* (Kachonpadungkitti *et al.*, 2001). Una relación alta en sacarosa y baja en nitrógeno estimuló el desarrollo reproductivo en *Torenia* sp. (Tanimoto y Harada, 1981), *Perilla crispa* (Wada y Totsuka, 1982), *P. nil* (Ishioka *et al.*, 1991),

D. pulcherrima x *K. philippensis* (Duan y Yazawa, 1994) y *M. charantia* (Wang *et al.*, 2001). No obstante, si las concentraciones de nitrógeno son muy bajas, el explante (vegetativo o reproductivo) no se desarrolla eficientemente (Hillman y Posner, 1971; Simmonds, 1982; Dickens y van Staden, 1988; Luo *et al.*, 2000).

Concentración de sacarosa

La participación de carbohidratos en el control de la floración ha sido discutida por varias décadas. La inducción floral es resultado de un aumento en el transporte de asimilados, especialmente sacarosa, hacia los meristemos apicales. Se ha observado que la concentración de sacarosa aumenta en los meristemos apicales durante la inducción floral en varias especies, incluyendo LDPs, SDPs o plantas que dependen de cambios en la temperatura para iniciar los procesos de floración. En PSF dicho transporte se da en estadios iniciales de la inducción floral, en los cuales no es posible que dicha movilización sea a causa de un aumento en las necesidades metabólicas del meristemo, tanto en condiciones *in vivo* (Bernier *et al.*, 1993; Perilleux y Bernier, 1997) como *in vitro* (Roldán *et al.*, 1999).

El transporte de sacarosa de las hojas hacia los meristemos durante la inducción floral ha hecho pensar que este compuesto podría ser la señal de estímulo para la floración. Aumentos en la concentración de sacarosa en SDPs pueden inducir a la floración. En PSF *in vitro*, una simple exposición a fotoperíodos inductivos resultó en un rápido aumento en los niveles de sacarosa en los productos transportados desde la hoja hacia los meristemos (Scorza, 1982; Roldán *et al.*, 1999). Sin embargo, en LDPs la floración se puede lograr mediante fotoperíodos inductivos que estimulan la floración sin necesidad de aumentar los niveles de sacarosa en los meristemos. Lo mismo ocurre en DSDPs, en donde fotoperíodos prolongados de baja intensidad inducen el estímulo de floración sin aumentar las concentraciones de sacarosa en los meristemos (Roldán *et al.*, 1999).

Las discrepancias entre los diferentes sistemas de PFS (SDPs, LDPs y DSDPs) en cuanto al transporte de sacarosa desde las hojas hacia los meristemos y la posibilidad de inducción floral sin necesidad de aumento en los niveles de sacarosa podría indicar que la presencia de sacarosa en el meristemo no está relacionada directamente con la inducción floral, sino más bien con el desarrollo de las estructuras florales *in vitro* (Scorza, 1982) o *in vivo* (Bernier *et al.*, 1993; Perilleux y Bernier, 1997; King y Ben-Tal, 2001). Sin embargo, un aumento en la concentración de sacarosa en el medio de cultivo sí puede aumentar el porcentaje de explantes que desarrollan flores *in vitro*. Esto

se ha observado en *S. nobilis* (Simmonds, 1982), *Leptinella nana* (Carson y Leung, 1994), *Bambusa* sp. (John y Nadgauda, 1999), *F. esculentum* (Kachonpadungkitti *et al.*, 2001) y el cruce *Citrus nobilis* x *C. deliciosa* (Singh *et al.*, 2006).

Se sabe muy poco sobre la relación que tiene el almidón con la inducción floral. Eimert *et al.* (1995) sugirieron que la acumulación de almidón produce cambios en el metabolismo del nitrógeno durante la inducción de este proceso. Además, postularon la existencia de vías metabólicas regulatorias comunes entre el catabolismo del almidón y la inducción floral en *Arabidopsis* sp. *in vitro*. Por otra parte, el acúmulo de almidón normalmente está relacionado con retrasos en la floración de *Lolium temulentum in vivo* (Perilleux y Bernier, 1997).

La relación sacarosa/giberelinas presenta una nueva ruta para la interpretación de la inducción floral. En *Fuchsia hybrida* se observó que conforme aumente la concentración de sacarosa y el nivel de giberelinas en el meristemo, este inicia el desarrollo reproductivo. Si solo se aumenta el nivel de giberelinas en el meristemo, el resultado es la elongación del tallo y la reducción de los niveles de sacarosa en el meristemo (King y Ben-Tal, 2001).

Temperatura

Muchas plantas en fase de crecimiento vegetativo no pueden iniciar la producción de estructuras reproductivas *in vitro* sin un apropiado tratamiento de vernalización (Luo *et al.*, 2000). En varias especies frutales, períodos con bajas temperaturas son requeridos para estimular la inducción floral. Durante la floración *in vitro* en *Citrus*, tratamientos con bajas temperaturas permitieron la transformación de los meristemos vegetativos en florales (Tisserat *et al.*, 1990; García-Luis *et al.*, 1992).

Algunos genes que actúan independientemente de la regulación fotoperiódica (*FCA*, *FPA*, *FVE*, *FY* o *LD*) se han considerado de gran importancia para la inducción floral durante fotoperíodos no inductivos. En muchos casos, este efecto puede ser sustituido por tratamientos de vernalización. En plantas susceptibles a la vernalización, la represión de la floración es causada por genes tales como *FRI*, *FLC* y *TFL*, los cuales promovieron el crecimiento vegetativo y evitaron el desarrollo de estructuras reproductivas en *Arabidopsis* sp. (Roldán *et al.*, 1999).

En *Phalaenopsis*, tratamientos de vernalización (los cuales normalmente pueden estimular la floración *in vivo*) no promovieron la inducción floral *in vitro* (Duan y Yazawa, 1995), lo cual sugiere que las condiciones para la inducción floral no siempre son similares en cultivo *in vitro* a las mostradas en crecimiento *ex vitro*.

Aireación y gelificación

La influencia de una buena aireación en medios de cultivo líquidos para el desarrollo de la floración ha sido estudiada, principalmente en relación con la reducción del fenómeno de la hiperhidricidad. No se ha informado la ocurrencia de floración *in vitro* en cultivos hiperhídricos, lo que podría sugerir que el proceso de hiperhidricidad inhibe la inducción floral, así como inhibe otros procesos morfogénicos *in vitro* (Scorza, 1982). Se ha indicado que un aumento en la concentración del agente gelificante en el medio de cultivo puede favorecer la producción de flores *in vitro* en *Cucumis sativus* cv. 'Marketmore-76' (Tisserat y Galleta, 1993) y *F. esculentum* (Kachonpadungkitti *et al.*, 2001).

EFFECTO DEL GENOTIPO EN LA INDUCCIÓN FLORAL *IN VITRO*

Se ha observado un efecto variable del genotipo en la inducción floral *in vitro*. Por un lado, diferentes cultivares de *Perilla crispa* (Wada y Totsuka, 1982), *Amaranthus* sp. (Tisserat y Galleta, 1988), *Solanum tuberosum* (papa) (Al-Wareh *et al.*, 1989), *Arachis hypogaea* (maní) (Kachonpadungkitti *et al.*, 1992), *Arabidopsis* (Roldán *et al.*, 1999), *Rosa* sp. (rosa) (Wang *et al.*, 2002), *Lycopersicon esculentum* (tomate) (Sheeja y Mandal, 2003) y *Zantedeschia* spp. (cala) (Naor *et al.*, 2004), utilizados en varios estudios de floración *in vitro*, no mostraron diferencias estructurales en las flores producidas ni en los procesos de inducción floral evaluados.

Sin embargo, en el caso de las especies *Begonia socotrana*, *B. sutherlandii*, *B. evansiana* y *B. multiflora*, así como de las variedades Gloire de Lorraine, Regent, Carrollina de Lucerna, Comte de Miribel, de esta especie, solo *B. socotrana* y la variedad Carrollina de Lucerna produjeron flores en respuesta a tratamientos evaluados *in vitro* (Ringe y Nitsch, 1968). La presencia de ácido indol acético (AIA) en el medio de cultivo pudo haber inhibido la inducción floral en los meristemas de las otras especies y variedades. En estudios realizados en *F. esculentum*, se identificaron diferencias estructurales entre las flores obtenidas (flores normales y enanas) en las mismas condiciones de cultivo entre diferentes genotipos de esta especie (Kachonpadungkitti *et al.*, 2001). Si bien las flores fueron morfológicamente idénticas, la alta concentración de sacarosa pudo actuar como un inhibidor del desarrollo de los meristemas florales. Por otra parte, de seis variedades de olivo (*O. europaea*) evaluadas por Chaari-Rkhis *et al.* (2006), solo la variedad Chemlali no presentó inducción floral *in vitro*. Esto probablemente se debió a que el medio de cultivo (bajo en nitrógeno) y las concentraciones evaluadas de AG₃ (1, 2 y 10 mg l⁻¹) no indujeron el estímulo deseado en este cultivar.

CONCLUSIONES

Las ventajas que presenta el cultivo *in vitro* para el estudio de la inducción floral radican en la facilidad para aplicar diversos estímulos que induzcan o inhiban este fenómeno sin involucrar las variantes ambientales (de Fossard, 1974; Scorza, 1982). En los últimos años, los estudios realizados *in vitro* han buscado establecer un modelo eficiente, reproducible y simple para la inducción floral. Lo anterior con el fin de facilitar estudios a nivel molecular y bioquímico de los procesos involucrados (inactivación, sobreexpresión, interacción entre genes y factores de transcripción). A nivel de aplicación práctica, podría retardarse la floración de cultivos que no requieran desarrollo reproductivo, inducir floración para acortar procesos de fitomejoramiento y reproducción, prevenir o reducir la producción de agentes alergénicos, así como controlar la producción y diseminación de polen en plantas transgénicas; sin olvidar el potencial uso comercial de las plantas ornamentales floreadas *in vitro* (Nadgauda *et al.*, 1990; Roldán *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2002; Laurie, 2004).

REFERENCIAS

- Al-Khayri, JM, Huang FH, Morelock TE (1991) *In vitro* flowering in regenerated shoots of spinach. HortScience 26: 1422
- Al-Wareh, H, Trolinder NR, Goodin JL (1989) *In vitro* flowering of potato. HortScience 24: 827-829
- Anitha, S, Kumari BDR (2006) *In vitro* flowering in *Rauvolfia tetraphylla* L. Pakistan Journal of Biological Sciences 9: 422-424
- Bais, H, Sudha G, Ravishankar G (2001) Influence of putrescine, silver nitrate and polyamine inhibitors on the morphogenetic response in untransformed and transformed tissue of *Cichorium intybus* and their regenerants. Plant Cell Reports 20: 547-555
- Barak, S, Tobin EM, Green RM, Andronis C, Sugano S (2000) All in good time: the *Arabidopsis* circadian clock. Trends in Plant Science 5: 517-522
- Bernier, G, Périlleux C (2005) A physiological overview of the genetics of flowering time control. Plant Biotechnology Journal 3: 316
- Bernier, G, Havelange A, Houssa C, Petitjean A, Lejeune P (1993) Physiological signals that induce flowering. The Plant Cell 5: 1147-1155
- Berghoef, J, Bruinsma J (1979) Flower development of *Begonia francois* Liebm. IV. Adventitious flower bud formation on excised inflorescence pedicels *in vitro*. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 94: 407-416
- Britto, SJ, Natarajan E, Arockiasamy DI (2003) *In vitro* flowering and shoot multiplication from nodal explants of *Ceropegia bulbosa* Roxb. var. *bulbosa*. Taiwanania 48: 106-111
- Carson, AJ, Leung DWM (1994) *In vitro* flowering and propagation of *Leptinella nana* L., an endangered plant. New Zealand Journal of Botany 32: 79-83
- Chaari-Rkhis, A, Maalej M, Ouled-Messaoud SO, Drira N (2006) *In vitro* vegetative growth and flowering of olive tree in

- response to GA₃ treatment. African Journal of Biotechnology 5: 2097-2302
- Chambers, SM, Heuch JHR, Pirle A (1991) Micropropagation and *in vitro* flowering of bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Munro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 27: 45-48
- Chang, C, Chang WC (2003) Cytokinins promotion of flowering in *Cymbidium ensifolium* var. *misericors* *in vitro*. Plant Growth Regulation 39: 217-221
- Chang, W, Hsing Y (1980) *In vitro* flowering of embryos derived from mature root callus of ginseng (*Panax ginseng*). Nature 284: 341-342
- de Fossard, R (1974) Flower initiation in tissue and organ culture. En: Street, H (Ed) Tissue culture and plant science, pp. 193-212. Academic Press. Londres
- Dewir, YH, Chakrabarty D, Ali MB, Singh N, Hahn EJ, Paek KY (2007) Influence of AG₃, sucrose and solid medium/bioreactor culture on *in vitro* flowering of *Spathiphyllum* and association of glutathione metabolism. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 90: 225-235
- Dewir, YH, Chakrabarty D, Hahn EJ, Datta SK, Paek KY (2008) Kinetics of nutrient utilization and photosynthetic enzyme activities during floral versus vegetative differentiation of *Spathiphyllum* in air-lift bioreactor cultures. Plant Growth Regulation 54: 157-164
- Dickens, CWS, van Staden J (1985) *In vitro* flowering and fruiting of soybean explants. Journal of Plant Physiology 120: 83-86
- Dickens, CWS, van Staden J (1988) The *in vitro* flowering of *Kalanchoe blossfeldiana* Poellniz I. Role of culture conditions and nutrients. Journal of Experimental Botany 39: 461-471
- Dickens, CWS, van Staden J (1990) The *in vitro* flowering of *Kalanchoe blossfeldiana* Poellniz II. The effect of growth regulators and gallic acid. Plant and Cell Physiology 31: 757-762
- Duan, JX, Yazawa S (1994) Induction of floral development in *x Doriella tiny* (*Doritis pulcherrima x Kingiella philippinensis*) *in vitro* and *in vivo*. Scientia Horticulturae 59: 253-261
- Duan, JX, Yazawa S (1995) Floral induction and development in *Phalaenopsis* *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 43: 71-74
- Eimert, K, Wang SM, Lue WL, Chen J (1995) Monogenic recessive mutations causing both late floral initiation and excess starch accumulation in *Arabidopsis*. The Plant Cell 7: 1703-1712
- Ferreira, W de M, Kerbauy GB, Kraus JE, Pescador R, Suzuki RM (2006) Thidiazuron influences the endogenous levels of cytokinins and IAA during the flowering of isolated shoots of *Dendrobium*. Journal of Plant Physiology 163: 1126-1134
- Franklin, G, Pius PK, Ignacimuthu S (2000) Factors affecting *in vitro* flowering and fruiting of green pea (*Pisum sativum* L.). Euphytica 115: 65-73
- Galoch, E, Czaplowska J, Burkacka-Laukajtys E, Kopcewicz J (2002) Induction and stimulation of *in vitro* flowering of *Pharbitis nil* by cytokinin and gibberellin. Plant Growth Regulation 37: 199-205
- Gamborg, OL, Miller LA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experiment of Cell Research 50: 151-158
- García-Luis, A, Kanduser M, Santamarina P, Guardiola JL (1992) Low temperature influence on flowering in *Citrus*. The separation of inductive and bud dormancy releasing effects. Physiologia Plantarum 86: 648-652
- Handro, W (1983) Effects of some growth regulators on *in vitro* flowering of *Streptocarpus nobilis*. Plant Cell Reports 2: 133-136
- Hayama, R, Coupland G (2003) Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering. Current Opinion in Plant Biology 6: 13-19
- Hee, KH, Loh CS, Yeoh HH (2007) Early *in vitro* flowering and seed production in culture in *Dendrobium* Chao Praya Smile (*Orchidaceae*). Plant Cell Reports 26: 2055-2062
- Hillman, WS, Posner HB (1971) Ammonium ion and the flowering of *Lemna perpusilla*. Plant Physiology 47: 586-587
- Hillson, TD, LaMotte CE (1977) *In vitro* formation and development of flower buds on tobacco stem explants. Plant Physiology 60: 881-884
- Ishioka, N, Tanimoto S, Harada H (1991) Roles of nitrogen and carbohydrate in flower-bud formation in *Pharbitis* apex cultures. Journal of Plant Physiology 138: 573-576
- John, CK, Nadgouda RS (1999) *In vitro*-induced flowering in bamboos. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 35: 309-315
- Joshi, M, Nadgouda RS (1997) Cytokinins and *in vitro* induction of flowering in bamboo: *Bambusa arundinacea* (Retz.) Willd. Current Science 73: 523-526
- Jumin, HB, Ahmad M (1999) High-frequency *in vitro* flowering of *Murraya paniculata* (L.) Jack. Plant Cell Reports 18: 764-768
- Jumin, HB, Nito N (1996) *In vitro* flowering of *Fortunella hindsii* (Champ.). Plant Cell Reports 15: 484-488
- Kachonpadungkitti, Y, Hisajima S, Arai Y (1992) Life cycle of peanut (*Arachis hypogaea* L.) plant *in vitro*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 56: 543-546
- Kachonpadungkitti, Y, Romchatgoen S, Hasegawa K, Hisajima S (2001) Efficient flower induction from cultured buckwheat (*Fagopyrum esculentum* L.) node segments *in vitro*. Plant Growth Regulation 35: 37-45
- Kerbauy, GB (1984) *In vitro* flowering of *Oncidium varicosum* mericlones (Orchidaceae). Plant Science Letters 35: 73-75
- King, RW, Ben-Tal Y (2001) A florigenic effect of sucrose in *Fuchsia hybrida* is blocked by gibberellin-induced assimilate competition. Plant Physiology 125: 488-496
- King, RW, Moritz T, Evans LT, Junttila O, Herlt AJ (2001) Long-day induction of flowering in *Lolium temulentum* involves sequential increases in specific gibberellins at the shoot apex. Plant Physiology 127: 624-632
- Knudson, L (1946) A new nutrient solution for orchid seed germination. American Orchid Society Bulletin 15: 214-217
- Kostenyuk, I, Oh BJ, So IS (1999) Induction of early flowering in *Cymbidium niveo-marginatum* Mak *in vitro*. Plant Cell Reports 19: 1-5
- Kumar, VA, Kumar A, Kumar J (1995) *In vitro* flowering and pod formation in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). Current Science 69: 543-545
- Laurie, D (2004) Flowering time. En: Christou, P y Klee, H (Eds). Handbook of Plant Biotechnology (Vol 1), pp. 659-671. Wiley, Chichester

- Liang, OP, Keng CL (2006) *In vitro* plant regeneration, flowering and fruiting of *Phyllanthus niruri* L. (*Euphorbiaceae*). International Journal of Botany 2: 409-414
- Lin, CS, Chang WC (1998) Micropropagation of *Bambusa edulis* through nodal explants of field-grown culms and flowering of regenerated plantlets. Plant Cell Reports 17: 617-620
- Lin, CS, Lin CC, Chang WC (2003) *In vitro* flowering of *Bambusa edulis* and subsequent plantlet survival. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 72: 71-78
- Lin, CS, Lin CC, Chang WC (2004) Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and flowering of bamboo *Bambusa edulis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76: 75-82
- Lin, CS, Liang CJ, Hsiao HW, Lin MJ, Chang, WC (2007) *In vitro* flowering of green and albino *Dendrocalamus latiflorus*. New Forests 34: 177- 186
- Lloyd, G, McCown B (1980) Commercially –feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society 30: 421-442
- Luo, P, Ye Q, Lan Z (2000) A study on floral biology of seedlings *in vitro* in *Orychophragmus violaceus*: Induction of flowers in seedlings of *O. violaceus* cultured *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 63: 73-75
- Mader, JC (2004) Differential *in vitro* development of inflorescences in long and short day *Lemna* spp.: Involvement of ethylene and polyamines. Journal of Plant Physiology 161: 653-663
- Maheshwari, P, Kumar A (2006) Organogenesis, shoot regeneration, and flowering response of *Vernonia cinerea* to different auxin/cytokinin combinations. *In vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 42: 589-595
- Makunga, NP, van Staden J (2008) An efficient system for the production of clonal plantlets of the medicinally important aromatic plant: *Salvia africana-lutea* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 92: 63-72
- McDaniel, CN King RW, Evans LT (1991) Floral determination and *in vitro* floral differentiation in isolated shoot apices of *Lolium temulentum*. Planta 182: 9-16
- Metzger, JD (1987) Hormones and reproductive development. En: Davies, PJ (Ed) Plant hormones and their role in plant growth and development, pp. 431-462. Martinus Nijhoff, Dordrecht
- Molina-Torres, J, Laidman DL, Gaunt JK (1989) The influence of photoperiod on incorporation of precursors into tocopherols and plastoquinone in *Xanthium strumarium* L. New Phytologist 111: 397-401
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497
- Murashige, T, Tucker D (1969) Growth factor requirements of citrus culture. Proceedings of the 1st International Citrus Symposium 3: 1155-1161
- Murthy, KSR, Ramulu DR, Rao JC, Emmanuel S, Pullaiah T (2006) *In vitro* flowering of *Spathoglottis plicata* Bl. (*Orchidaceae*). Phytomorphology 56: 117-120
- Nadgauda, RS, Parasharami, VA y Mascarenhas, AF (1990) Precocious flowering and seeding behavior in tissue cultured bamboos. Nature 344: 335-336
- Nadgauda, RS, John CK, Parasharami VA, Joshi MS, Mascarenhas AF (1997) A comparison of *in vitro* with *in vivo* flowering in bamboo: *Bambusa arundinacea*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 48: 181-188
- Nair, AK, Dilip ND, Subhash PS (2007) High-frequency *in vitro* flowering in six species of *Ceropegia*. Journal of Plant Biology 50: 374-377
- Naor, V, Kigel J, Ziv M (2004) Hormonal control of inflorescence development in plantlets of calla lily (*Zantedeschia* spp.) grown *in vitro*. Plant Growth Regulation 42: 7-14
- Nitsch, JP, Nitsch C (1965) Néof ormation de fleurs *in vitro* chez une espèce de jours courts: *Plumbago indica* L. Annales de Physiologie Vegetale 7: 251-256
- Peeters, AJM, Gerards W, Barendse GWM, Wullems GJ (1991) *In vitro* flower bud formation in tobacco: interaction of hormones. Plant Physiology 97: 402-408
- Perilleux, C, Bernier G (1997) Leaf carbohydrate status in *Lolium temulentum* during the induction of flowering. New Phytologist 135: 59-66
- Perilleux, C, Bernier G, Kinet JM (1994) Circadian rhythms and the induction of flowering in the long-day grass *Lolium temulentum* L. Plant, Cell and Environment 17: 755-761
- Pirson, A, Seidel F (1950) Zell- und stoffwechselfysiologische Untersuchungen an der Wurzel von *Lemna minor* L. unter besonderer Berücksichtigung von Kalium- und Kalziummangel. Planta 38: 431-473
- Prakash, G (1977) Plant growth regulators and sex expression in flower buds of *Momordica charantia* *in vitro*. Current Science 46: 328-330
- Qiao, Q, Xing F-W, Xiao Y-P, Chen H-F (2009) Somatic embryogenesis and *in vitro* flowering in *Saposhnikovia divaricata*. Journal of Plant Growth Regulation 28: 81-86
- Rajasekaran, K, Mullins MG, Nair Y (1983) Flower formation *in vitro* by hypocotyl explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Annals of Botany 52: 417-420
- Ramanayake, SMSD, Wanniarachchi WAVR, Tennakoon TMA (2001) Axillary shoot proliferation and *in vitro* flowering in an adult giant bamboo, *Dendrocalamus giganteus* Wall. Ex Munro. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 37: 667–671
- Reed, JW, Foster KR, Morgan PW, Chory J (1996) Phytochrome B affects responsiveness to gibberellins in *Arabidopsis*. Plant Physiology 112: 337-342
- Reid, R, Jones H, Smith H (2004) Phytochromes - Biotechnological prospects. En: Christou, P y Klee, H (Eds) Handbook of Plant Biotechnology (Vol 1), pp. 725-737, Wiley, Chichester.
- Ringe, F, Nitsch JP (1968) Conditions leading to flower formation on excised *Begonia* fragments cultured *in vitro*. Plant and Cell Physiology 9: 639-652
- Roberts, NJ, Luckman GA, Menary RC (1993) *In vitro* flowering of *Boronia megastigma* Nees. and the effect of 6-benzylaminopurine. Plant Growth Regulation 12: 117-122
- Roldán, M, Gómez-Mena C, Ruiz-García L, Salinas J, Martínez-Zapater JM (1999) Sucrose availability on aerial part of the plant promotes morphogenesis and flowering of *Arabidopsis* in the dark. The Plant Journal 20: 581-590
- Rout, GR, Das P (1994) Somatic embryogenesis and *in vitro* flowering of 3 species of bamboo. Plant Cell Reports 13: 683-686

- Rugini, E (1984) *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea* Savatina L.) cultivars with different rootability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulturae* 24: 123-134
- Sankhla, D, Davis TD, Sankhla N, Upadhyaya A (1994) *In vitro* production of flowering shoots in 'German Red' carnation: effect of uniconazole and gibberellic acid. *Plant Cell Reports* 13: 514-518
- Saritha, KV, Naidu CV (2007) *In vitro* flowering of *Withania somnifera* Dunal.-An important antitumor medicinal plant. *Plant Science* 172: 847-851
- Saxena, SN, Kaushik N, Sharma R (2008) Effect of abscisic acid and proline on *in vitro* flowering in *Vigna aconitifolia*. *Biologia Plantarum* 52: 181-183
- Scorza, R (1982) *In vitro* flowering. *Horticultural Reviews* 4: 106-127
- Scorza, R, Janick J (1980) *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 105: 892-897
- Sharma, A, Kumar V, Giridhar P, Ravishankar GA (2008) Induction of *in vitro* flowering in *Capsicum frutescens* under the influence of silver nitrate and cobalt chloride and pollen transformation. *Electronic Journal of Biotechnology* 11: 1-6
- Sheeja, TE, Mandal AB (2003) *In vitro* flowering and fruiting in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 11: 37-42
- Sim, GE, Loh CS, Goh CJ (2007) High frequency early *in vitro* flowering of *Dendrobium* Madame Thong-In (*Orchidaceae*). *Plant Cell Reports* 26: 383-393
- Sim, GE, Loh JG, Loh CS (2008) Induction of *in vitro* flowering in *Dendrobium* Madame Thong-In (*Orchidaceae*) seedlings is associated with increase in endogenous N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)-adenine (iP) and N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)-adenosine (iPA) levels. *Plant Cell Reports* 27: 1281-1289
- Simmonds, J (1982) *In vitro* flowering on leaf explants of *Streptocarpus nobilis*. The influence of culture medium components on vegetative and reproductive development. *Canadian Journal of Botany* 60: 1461-1468
- Singh, B, Sharma S, Rani G, Virk GS, Zaidi AA, Nagpal A (2006) *In vitro* flowering in embryogenic cultures of Kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour x *C. Deliciosa* Tenora). *African Journal of Biotechnology* 5: 1470-1474
- Sivanesan, I, Jeong BR (2007) Micropropagation and *in vitro* flowering in *Pentanema indicum* Ling. *Plant Biotechnology* 24: 527-532
- Steffen, JD, Sachs RM, Hackett WP (1988) *Bougainvillea* inflorescence meristem development: comparative action of GA₃ *in vivo* and *in vitro*. *American Journal of Botany* 75: 403-408
- Tang, AF, Cappadocia M, Byrne D (1983) *In vitro* flowering in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2: 199-206
- Tanimoto, S, Harada H (1981) Effects of IAA, zeatin, ammonium nitrate and sucrose on the initiation and development of flower buds in *Torenia* stem segments cultured *in vitro*. *Plant and Cell Physiology* 22: 1553-1560
- Taylor, NJ, Light ME, van Staden J (2005) *In vitro* flowering of *Kniphofia leucocephala*: influence of cytokinins. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83: 327-333
- Taylor, NJ, Light ME, van Staden J (2007) Monosaccharides promote flowering in *Kniphofia leucocephala* *in vitro*. *Plant Growth Regulation* 52: 73-79
- Tee, CS, Maziah M, Tan CS (2008) Induction of *in vitro* flowering in the orchid *Dendrobium* Sonia 17. *Biologia Plantarum* 52: 723-726
- Tisserat, B, Galletta PD (1988) *In vitro* flowering in *Amaranthus*. *HortScience* 23: 210-212
- Tisserat, B, Galletta PD (1993) Production of cucumber fruits from the culture of 'Marketmore-76' plantlet. *Plant Cell Reports* 13: 37-40
- Tisserat, B, Galletta PD, Jones D (1990) *In vitro* flowering from *Citrus limon* lateral buds. *Journal of Plant Physiology* 136: 56-60
- Tiwari, S, Tuli R (2008) Factors promoting efficient *in vitro* regeneration from de-embryonated cotyledon explants of *Arachis hypogaea* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92: 15-24
- Vacin, E, Went F (1949) Some pH changes in nutrient solution. *Botanic Gardens Conservation News* 110: 605-613
- Vaz, APA, Figueiredo-Ribeiro RCL, Kerbauy GB (2004) Photoperiod and temperature effects on *in vitro* growth and flowering of *P. pusilla*, an epiphytic orchid. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 411-415
- Virupakshi, S, Manjunatha BR, Naik GR (2002) *In vitro* flower induction in callus from a juvenile explant of sugarcane, *Saccharum officinarum* L., Var. CoC 671. *Current Science* 83: 1195-1197
- Vu, NH, Anh PH, Nhut DT (2006) The role of sucrose and different cytokinins in the *in vitro* floral morphogenesis of rose (hybrid tea) cv. «First Prize». *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87: 315-320
- Wada, K, Totsuka T (1982) Long-day flowering of *Perilla* plants cultured in nitrogen-poor media. *Plant and Cell Physiology* 23: 977-985
- Wang, X (1988) Tissue culture of *Cymbidium*: Plant and flower induction *in vitro*. *Lindleyana* 3: 184-189
- Wang, S, Tang L, Chen F (2001) *In vitro* flowering of bitter melon. *Plant Cell Reports* 20: 393-397
- Wang, GY, Yuan, MF, Hong Y (2002) *In vitro* flower induction in roses. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 38: 513-518
- Zhang, Z, Leung DWM (2000) A comparison of *in vitro* with *in vivo* flowering in gentian. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 223-226
- Zhang, Z, Leung DWM (2002) Factors influencing the growth of micropropagated shoots and *in vitro* flowering in gentian. *Plant Growth Regulation* 36: 245-252
- Ziv, M, Naor V (2006) Flowering of geophytes *in vitro*. *Propagation of Ornamental Plants* 6: 3-16