

## Cultivo *in vitro* de pétalos de cuatro variedades de *Begonia elatior*

Fernanda MartínezVelasco<sup>1</sup>  
Héctor González Rosas<sup>1§</sup>  
Ana María Castillo González<sup>2</sup>  
Elda Aracely Gaytán Acuña<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Fruticultura-Instituto de Recursos Genéticos y Productividad-Colegio de Postgraduados, Carretera Montecillo-Texcoco km 36.5, Texcoco, Estado de México. CP. 56230. Tel. 01(55) 58045900, ext. 1518. <sup>2</sup>Departamento de Fitotecnia-Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Texcoco, Estado de México.

§Autor para correspondencia: hectorgr@colpos.mx.

### Resumen

Esta investigación se llevó a cabo con el objetivo de establecer el protocolo para conocer la totipotencia del pétalo para la generación de plántula masivamente mediante la adición, al medio de cultivo, de una auxina y una citocinina e inducir la clonación de cuatro variedades de *Begonia elatior*. Se emplearon pétalos completos que fueron cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog en un diseño experimental completamente al azar consistente en cinco niveles combinados de ANA y BA (0, 1, 0.5, 2 y 3 mg L<sup>-1</sup>). La mayor regeneración de callo registró, en promedio, de 57.2%, en pétalos de la cv 'Heidi' y de 46.4% en la variedad 'Gloriosa'. Estos resultados se dieron a los 65 días de cultivo medio MS suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA y 1 mg L<sup>-1</sup> de BA. La mejor formación de brotes y crecimiento se obtuvo el medio MS adicionado con 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA y 1 mg L<sup>-1</sup> de BA con 13.2% en la variedad 'Heidi' y 'Gloriosa'. Ocasionalmente se presentaron yemas florales en el tratamiento 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA+ 1 mg L<sup>-1</sup> de BA en la cv 'Heidi'. La formación de raíz se obtuvo, únicamente, en la variedad 'Heidi' y se indujo en el tratamiento 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA+ 1 mg L<sup>-1</sup> de BA. Es posible obtener plántulas a partir de pétalos de *Begonia elatior*.

**Palabras clave:** auxina, citocinina, organogénesis indirecta.

Recibido: june de 2018

Aceptado: agosto de 2018

## Introducción

La familia begoniácea comprende cinco géneros y 920 especies de las cuales la mayoría pertenecen al género *Begonia* (Mendi *et al.*, 2009; Kabirnataj *et al.*, 2012). El género *Begonia* comprende aproximadamente 2000 variedades y alrededor de 200 especies que han sido introducidas por cultivadores comerciales, entre ellas *Begonia tuberhybrida*, *B. rex*, *B. semperflorens*, *Begonia* × *hiemalis*, *Begonia* × *elatior*, *Begonia* × *cheimantha* y *Begonia* × *socotrana* (Takayama, 1982). Las begonias forman parte de nuestras plantas de adorno más bonitas y variadas. La *Begonia* ha sido, durante años, la primera planta de flor en Europa Central y aunque en la actualidad ya no es tan vendida se mantiene una posición privilegiada entre las 10 primeras comerciales (Rout *et al.*, 2006).

Las begonias son importantes como plantas ornamentales perennes que están distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Se emplean en jardinería para la implantación de macizos y bordes y como plantas de maceta. En general, son propagadas por semilla o vegetativamente por esqueje de hoja, rizomas, tubérculos y principalmente por esqueje de hoja con peciolo (Mendi *et al.*, 2009). No obstante, es posible que métodos convencionales de propagación sean problemáticos debido a la rápida aparición de enfermedades. Además, La producción de grandes cantidades de plantas genéticamente homogéneas es también muy difícil.

*Begonia elatior*, es el producto de la cruce de *B. socotrana* x *B. tuberhybrida* y se conoce como *B. hiemalis* y es considerada como una flor con gran potencial por la gran aceptación en el consumo local, pero con un buen manejo en su comercialización se puede considerar para el mercado internacional. En el mercado nacional es la predominante puesto que las ventas señalan que es de alrededor de 90% y posiblemente su demanda se incremente. Sin embargo, por ser un producto de importación, el costo por esqueje es de 0.45 €, un equivalente aproximado de \$10.00 costo que resulta alto. La propagación de *Begonia elatior*, es importante desde el punto de vista comercial. Ante esta situación, se requiere de un método que permita la obtención de material vegetativo a un bajo costo de producción y con alta calidad.

Para el desarrollo de esta investigación se empleó la micropropagación como una herramienta para la propagación masiva de *Begonia elatior*. Para el desarrollo de la investigación se escogió como explante al pétalo porque a pesar que las begonias han sido estudiadas por diversos investigadores (Takayama and Misawa, 1982; Simmonds y Werry, 1987; Bowes y Curtis, 1991; Nakano *et al.*, 1999; Bouman and Klerk, 2001; Kishimoto *et al.*, 2002; Burritt y Leung, 2003; Espino *et al.*, 2004; Nhut *et al.*, 2005; 2006; Shimada *et al.*, 2007; Mendi *et al.*, 2009; Romocea *et al.*, 2010; Kabirnataj *et al.*, 2012). Existe poca o nula información sobre el cultivo *in vitro* de pétalo de *Begonia elatior* como material madre por lo que pensamos que puede ser interesante y barato este tipo de explante sobre todo por la cantidad de flores y pétalos que se tiene en una planta. Además, mediante la micropropagación se puede obtener planta de alta calidad que es una condición necesaria y crítica para los productores (Chebet *et al.*, 2003). Por lo anterior, el presente trabajo se orientó, como método alternativo de propagación masiva de *Begonia elatior*, el establecimiento de un protocolo para conocer, mediante la manipulación hormonal, el potencial organogénético del pétalo para la generación clonal de plántulas.

## Materiales y métodos

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología (sección de cultivo de tejidos) en el área de agronomía de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), Texcoco, Estado de México y en el laboratorio de embriogénesis perteneciente al área de fruticultura, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo.

Como material experimental se emplearon cuatro variedades de plantas de *Begonia elatior* ('Heidi', 'Clara', 'Gloriosa' y 'Tacora gee') que se compraron en el mercado 'Madre Selva' delegación Xochimilco, Cd. de México. Las variedades fueron 'Tacora gel' (pétalos amarillos), 'Gloriosa' (naranja), 'Heidi' (rojo) y 'Clara' (blanca).

Los pétalos utilizados se extrajeron de flores masculinas (2 a 3 cm) ubicadas en el segundo y tercer piso de la estructura de la planta. Pétalos completos de las cuatro variedades se lavaron, para eliminar el polvo, con agua jabonosa en agua corriente por 30 min y se sumergieron con alcohol al 70% por 20 s, se esterilizaron en hipoclorito de calcio al 4% con dos gotas de tween 20 por 15 min. Los explantes se enjuagaron tres veces con agua bidestilada esterilizada y sembraron en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) suplementado con glicina 0.2 mg L<sup>-1</sup>, ácido nicotínico 0.5 mg L<sup>-1</sup>, mio-inositol 100 mg L<sup>-1</sup>, piridoxina 0.5 mg L<sup>-1</sup>, tiamina-HCl 0.4 mg L<sup>-1</sup>, 30 gL<sup>-1</sup> de sacarosa, 7.5 gL<sup>-1</sup> de agar (sigma) y los reguladores del crecimiento el ácido naftalenacético (ANA) y bencilamino purina (BA) que se adicionaron en combinación y el testigo. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 o 5.8 con 0.1N de NaOH ó 0.1N de HCl. El medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) se esterilizó en autoclave a 10 kg cm<sup>-2</sup> a 120 °C por 15 min. y se sirvió en frascos tipo gerber (20 mL/frasco) con tapas de plástico. Los pétalos se incubaron a una temperatura de 26 °C ± 2 °C con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad y una intensidad luminosa de 50 µM m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> durante todo el experimento.

### Establecimiento del inóculo

Pétalos de las cuatro variedades se inocularon en el medio de cultivo MS conteniendo concentraciones y combinaciones de BA y ANA en los tratamientos siguientes: 1) 0 mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0 mg L<sup>-1</sup> de BA; 2) 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA + 1 mg L<sup>-1</sup> de BA; 3) 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA + 2 mg L<sup>-1</sup> de BA; 4) 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA + 2 mg L<sup>-1</sup> de BA; y 5) 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA + 3 mg L<sup>-1</sup> de BA.

### Multiplicación

Para la micropropagación se emplearon las plántulas regeneradas que se subcultivaron en medio de establecimiento fresco adicionado con las mismas concentraciones de ANA y BA usadas para el establecimiento del explante.

### Inducción de la raíz

Para la inducción de la raíz, las plántulas se transfirieron a un medio con el tratamiento 2 (1 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 1 mg L<sup>-1</sup> BA).

## Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con factorial  $4^5$  donde los factores a evaluar fueron: variedad y concentración de reguladores de crecimiento, generándose 20 tratamientos con 10 repeticiones dando como resultado 200 unidades experimentales. Se sembraron dos pétalos por frasco. Los análisis estadísticos para la variable número de brotes, se llevó a cabo con el programa Infostat (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Muestra factorial: variedad de begonia y concentración de ANA +BA.**

Factor 1 Variedad	Factor 2 concentración de ANA y BA
	$M_I = 0 \text{ mg L}^{-1} \text{ (ANA)} + 0 \text{ mg L}^{-1} \text{ (BA)}$
$C_1 = \text{Clara}$	$M_{II} = 1 \text{ mg L}^{-1} \text{ (ANA)} + 1 \text{ mg L}^{-1} \text{ (BA)}$
$C_2 = \text{Heidi}$	$M_{III} = 0.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ (ANA)} + 2 \text{ mg L}^{-1} \text{ (BA)}$
$C_3 = \text{Gloriosa}$	$M_{IV} = 1 \text{ mg L}^{-1} \text{ (ANA)} + 2 \text{ mg L}^{-1} \text{ (BA)}$
$C_4 = \text{Tacora geel}$	$M_V = 0.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ (ANA)} + 3 \text{ mg L}^{-1} \text{ (BA)}$

Letra C corresponde a las variedades de la flor y la M a la concentración de las hormonas ANA y BA.

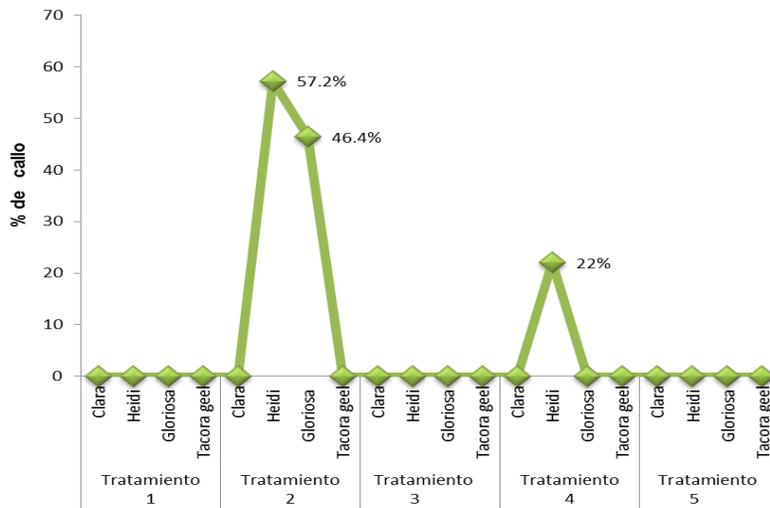
Las variables a estudiar fueron las siguientes: tiempo de formación y el porcentaje de callos, número promedio de pétalos con brotes por variedad, número de brotes promedio por pétalo, días para formación de raíces. Todas las evaluaciones se realizaron cada 15 días

## Resultados y discusión

### Formación de callo

La formación de callo se presentó en la base del pétalo a los 120 días después de la siembra. Los tratamientos que dieron positivo para la formación de callo fueron el 2 ( $1 \text{ mg L}^{-1}$  (ANA) +  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BA) y el tratamiento 4 ( $1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA) +  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BA). En la variedad 'Heidi' el valor fue, en promedio, de 57.2% y en el tratamiento 4 un 22%; en 'Gloriosa', en el tratamiento 4 ( $1 \text{ mg L}^{-1}$  (ANA) +  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BA), se obtuvo un porcentaje promedio de 46 (Figura 1). El tratamiento 2 concuerda con Datta (2002) quien reportó, en estudios llevados a cabo en Rosa sp., que el desarrollo de callos a partir de explantes de pétalo en siete cultivares (Contempo, America's Junior Miss, Manasi, Mrinalini, Preyasi, Sylvia y Queen Elizabeth), fue satisfactorio, para la formación de callos, en medio MS con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA y  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BA.

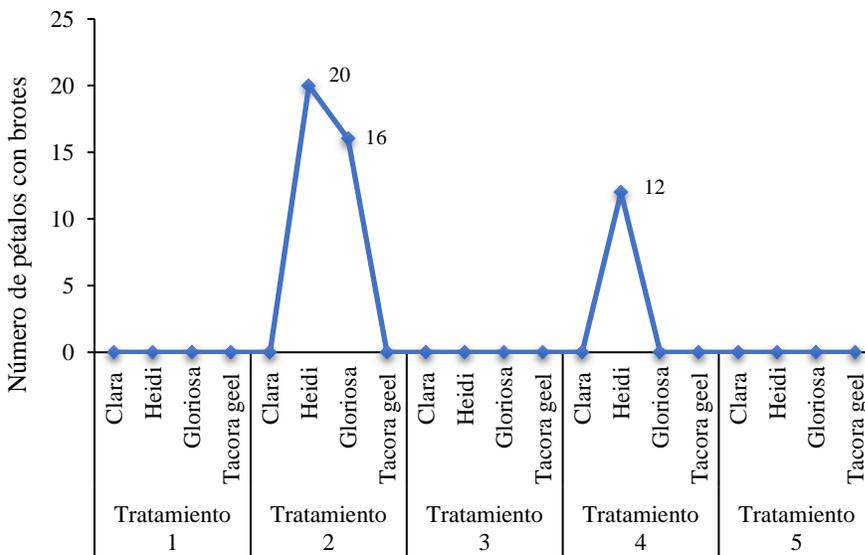
Los resultados indican que no se tuvo éxito con las variedades 'Tacora geel' y 'Clara' en ningún tratamiento. Esta variación de no formación de callo, de acuerdo con Bonga (1987), puede atribuirse a la distinta capacidad de regeneración o sensibilidad de los pétalos y que ello está dependiendo de la madurez del explante (pétalo) en relación a las concentraciones de ANA y BA.



**Figura 1. Formación de callo de pétalos expresado en porcentaje de cuatro variedades de *Begonia elatior* cultivadas en los tratamientos 2 y 4 de BA/ANA en medio MS.**

**Número de pétalos con brote**

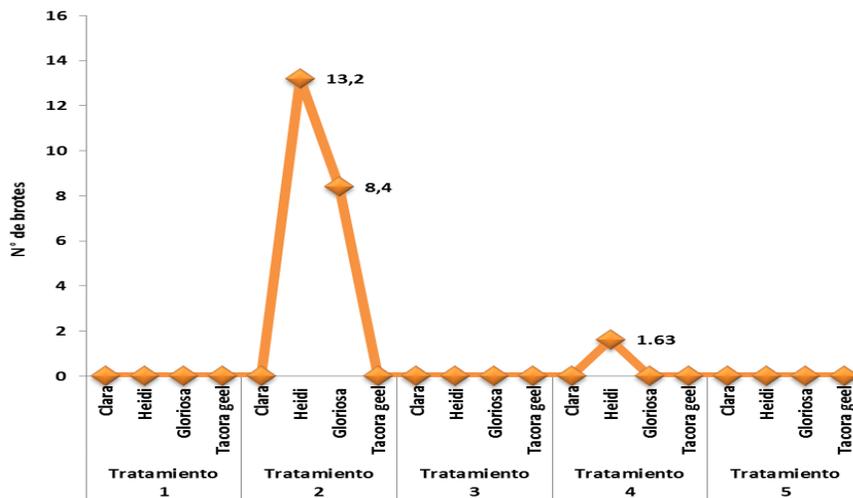
La Figura 2 muestra las variedades que generaron brotes adventicios. Se observó, que en las variedades ‘Clara’ y ‘Tacora gel’ no hubo algún tipo de respuesta organogénica. En contraste, en la variedad ‘Heidi’ en el tratamiento 2 (1 mg L<sup>-1</sup> de ANA+ 1 mg L<sup>-1</sup> de BA), 20 pétalos mostraron respuesta, además, la misma variedad en el tratamiento 4 (1 mg L<sup>-1</sup> ANA + 2 mg L<sup>-1</sup> BA) presentó 12 pétalos con brotes adventicios. La variedad ‘Gloriosa’, en el tratamiento 2 (1 mg L<sup>-1</sup> de ANA+ 1 mg L<sup>-1</sup> de BA), 16 pétalos mostraron respuesta organogénica.



**Figura 2. Efecto de combinación de ácido  $\alpha$ -naftaleno-acético (ANA) y benciladenina (BA) sobre el número de pétalos con brotes de las cuatro variedades. Los datos están expresados en porcentaje promedio de diez repeticiones.**

### Número de brotes por pétalo

La obtención de brotes, mediante organogénesis indirecta, se inició en la zona de inserción de los pétalos con el receptáculo entre los 60 y 65 días después de la siembra. En la variedad ‘Heidi’, la formación de brotes empezó a los 65 días en el tratamiento 2 (1 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 1 mg L<sup>-1</sup> BA) obteniéndose un promedio de 13.2/pétalo y 105 días en el tratamiento 4 (1 mg L<sup>-1</sup> ANA + 2 mg L<sup>-1</sup> BA) generando un promedio de 1.63/pétalo (Figura 3). Por lo tanto, existe una diferencia significativa entre ambos tratamientos. En el caso de la variedad ‘Gloriosa’, la brotación se observó a los 60 días únicamente en el tratamiento de 1 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 1 mg L<sup>-1</sup> BA con un promedio de 8.4/pétalo (Figura 3). De acuerdo a los resultados obtenidos, la multiplicación se logró en el tratamiento 2 con la concentración de 1:1 en la relación BA/ANA.

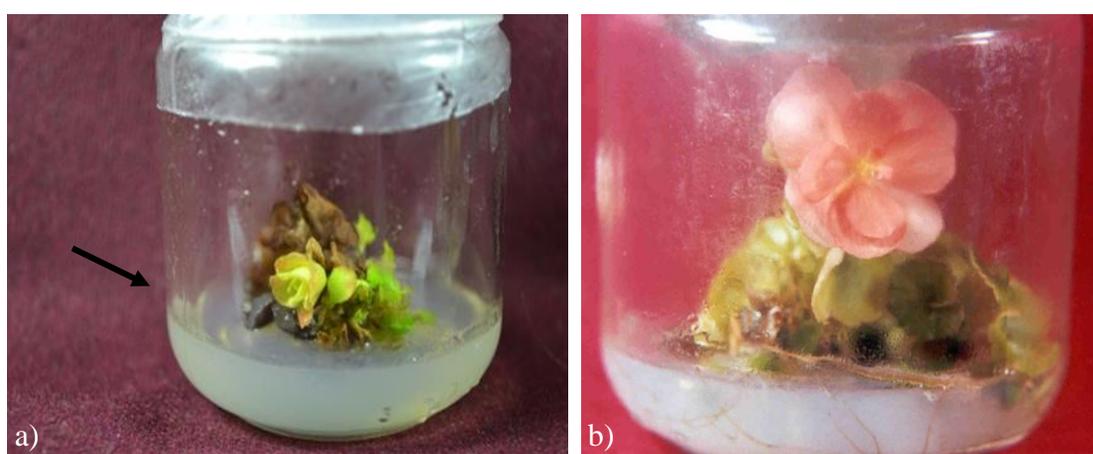


**Figura 3. Efecto de combinación del ácido  $\alpha$ -naftaleno-acético (ANA) y benciladenina (BA) sobre el número de brotes/pétalo de las cuatro variedades.** Los datos están expresados en porcentaje promedio de diez repeticiones.

Teóricamente esa proporción debiere de ser formación de callo, pero en esta investigación, además de producir callo, se indujo la generación de brotes, se puede suponer que la respuesta está directamente relacionada con una concentración endógena de la citocinina en el explante. Usualmente se requiere una concentración alta de citocininas que combinadas con una auxina se tiene resultados más efectivos en el caso del género *Begonia* (Takayama y Misawa, 1982). Mendi (2009) considera que la combinación 1 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 1 mg L<sup>-1</sup> BA produce una baja regeneración y que pudiese ser causada por un efecto antagónico del ANA sobre la BA pues considera que 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA es alto para hoja y pedicelo.

En contraste, Pierik y Tetteroo, (1987) indujeron brotación en inflorescencias (yemas florales), no pétalos, empleando la concentración de 0.5 mg L<sup>-1</sup> tanto para BA como para ANA (1:1). Rosna *et al.* (2009) en peciolo y Asmah Awal *et al.* (2013), empleando inflorescencias jóvenes y pedúnculos como material experimental, promovieron la formación de brotes con el tratamiento de 1 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 1 mg L<sup>-1</sup> BA con la adición al medio MS de 40 mg L<sup>-1</sup> de adenina. Estos resultados con sacarosa avalan que la combinación 1 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 1 mg L<sup>-1</sup> BA (1:1) es apropiada para la inducción de la organogénesis indirecta de brotes adventicios y por consecuencia para la multiplicación en pétalos de *Begonia elatior*.

Se debe consignar, que durante el desarrollo de la investigación se observó un aspecto que se considera conveniente mencionar. Se refiere a los brotes provenientes de pétalos de las variedades 'Heidi' y 'Gloriosa' sembrados en el tratamiento 2, en los cuales se obtuvo la formación de yemas florales que en algunos casos se desarrollaron hasta la formación de la flor (Figura 4a y 4b). En este sentido se hace necesario señalar que el pétalo es susceptible de generar, a través de la organogénesis, yemas florales. Al respecto, Awal *et al.* (2013) obtuvo la formación de flores al cultivar yemas florales y pedúnculos plantas de *Begonia elatior* en medio MS complementado ANA y BA en concentración con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  ANA+  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BA (1:1), pero agregó adenina ( $40 \text{ mg L}^{-1}$ ). Considera que es posible que la concentración de la sacarosa pueda inducir el proceso de la formación del brote floral, sin definir la concentración óptima. Nguyen *et al.* (2006) determinaron que el proceso de formación de yemas florales se debe a la relación sacarosa y citocininas lo cual permite la inducción de la floración en el sistema *Begonia*.



**Figura 4. a) generación de brote yema floral de la var. 'Gloriosa' en medio MS suplementado con ANA y BA (flecha); y b) desarrollo del botón floral de la var. 'Heidi' *in vitro*.**

En general, la sacarosa se utiliza con frecuencia como fuente de carbono para estudios *in vitro* con flores. Takimoto (1960) afirmó que las plantas que producen pequeñas cantidades de clorofila podían tener la capacidad para generar la formación de brotes florales con independencia de las condiciones de luz y que la sacarosa exógena puede sustituir el requisito de alta intensidad de la luz. Se presupone, que la iniciación floral *in vitro* puede requerir de un período de incubación largo de oscuridad y la presencia de sacarosa, además de las hormonas. Jumin and Nito (1996) en *Fortunella hindsii* y Kachonpadungkitti *et al.* (2001) en *Fagopyrum esculentum*, concluyeron que la sacarosa tiene efecto sobre la inducción de brotes florales. Zhang *et al.* (2008) mencionó que en, *Perilla frutescens*, la presencia de sacarosa, a partir de cultivos de inflorescencia, induce la formación de yemas florales. Cabe mencionar que esta es la primera vez que se hace mención que a partir de pétalos de *Begonia elatior* se puede obtener, por un lado, plántulas y por otro, la posibilidad de inducir la formación de yemas florales y la floración *in vitro*.

### Formación de raíz

La rizogénesis fue inducida solamente en la variedad 'Heidi' (Figura 5) a los 90 días después de la siembra, en el medio MS en el tratamiento 2 ( $1 \text{ mg L}^{-1}$  ANA+  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BA). Las plántulas de la var. 'Heidi' desarrollaron raíces de aproximadamente, en promedio, 1.5 cm de longitud.



**Figura 5. Enraizamiento de plántulas derivadas de brotes subcultivadas en medio MS con la adición de reguladores del crecimiento a los 120 días.**

## Conclusiones

Se cumplió con el objetivo principal de conocer si los pétalos son capaces de desdiferenciarse y sufrir una rediferenciación al lograr la obtención de plántulas.

La organogénesis o la obtención de brotes adventicios es factible a partir de callo derivado del pétalo en las dos concentraciones de BA y ANA usadas en el experimento ( $1 \text{ mg L}^{-1}$  ANA+  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BA y  $1 \text{ mg L}^{-1}$  ANA +  $2 \text{ mg L}^{-1}$  BA).

Para la inducción del callo se requieren de BA y NAA en una concentración de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  ANA+  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BA.

El cultivo de tejidos mediante cultivo de pétalos de *Begonia elatior*, puede mejorar la propagación ornamental para lograr una producción de bajo costo.

El enraizamiento de las plántulas se obtiene en el medio de multiplicación con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  ANA+  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BA.

El factor color de pétalo debe ser estudiado para conocer si afecta la organogénesis puesto que no todas las variedades produjeron plántulas. Aparentemente la organogénesis se produce en colores intensos como el rojo y naranja. Los colores claros (amarillo y blanco) no mostraron indicios de organogénesis.

Otro factor que requiere de estudio es determinar si las citocininas y la sacarosa son o no inductores de la formación de yemas florales en el cultivo *in vitro* de pétalos de *Begonia elatior*.

## Literatura citada

- Asmah, A.; Abdul, B. A. A.; Rosna, M. T. and Jamilah, S. Y. and Sadegh, M. 2013. Effect of adenine, sucrose and plant growth regulators on the indirect organogenesis and on *in vitro* flowering in *Begonia x hiemalis* Fotsch. *AJCS*. 7(5):691-698.
- Bouman, H. and De Klerk, G. J. 2001. Measurement of the extent of somaclonal variation in Begonia plants regenerated under various conditions. Comparison of Three Assays, *Theor. Appl. Genet.* 102(1):111-117.
- Bowes, B. G. and Curtis, E. W. 1991. Conservation of the British national Begonia collection by micropropagation. *New Phytologist*. 119(1):169-181.
- Burrill, D. J. and Leung, D. W. M. 2003. Adventitious shoot regeneration from Begonia x Erythrophylla petiole sections is developmentally sensitive to light quality. *Physiol. Plantarum*. 118(2):289-296.
- Chebet, D. K.; Okeno, J. A. and Mathenge, P. 2003. Biotechnological approaches to improve horticultural crop production. *Acta Hort.* 625:473-477.
- Datta, S. K. 2002. *In vitro* petal culture and callus formation in Rosa species. *Indian J. Agric. Sci.* 72(5):271-276.
- Espino, F. J.; Linacero, R.; Rueda, J. and Vázquez, A. M. 2004. Shoot regeneration in four Begonia genotypes. *Biol. Plant.* 48(1):101-104.
- Jumin, H. B. and Nito, N. 1996. *In vitro* flowering of *Fortunella hindsii* (Champ.). *Plant Cell Rep.* 15:484-488.
- Kabirnataj, S.; Ghasemi, Y.; Nematzadeh, G.; Asgharzadeh, R.; Shahin, K. B. and Yazdani, M. 2012. Effect of explant type and growth regulators on in vitro micropropagation of Begonia rex. *Inter. Res. J. Appl. Basic Sci.* 3(4):896-901.
- Kachonpadungkittl, Y.; Romchatgoen, S.; Hasegawa, K. and Hisajima, S. 2001. Efficient flower induction from cultured buckwheat (*Fagopyrum esculentum* L.) node segments *in vitro*. *Plant Growth Regul.* 35:37-45.
- Kishimoto, S.; Aida, R. and Shibata, M. 2002. Agrobacterium tumefaciens mediated transformation of elatior Begonia (Begonia x Hiemalis Fotsch). *Plant Sci.* 162(5): 697-703.
- Mendi, Y. Y.; Curuk, P.; Kocaman, E.; Unek, C.; Eldogan, S.; Gencel, G. and Cetiner, S. 2009. Regeneration of begonia plantlets by direct organogenesis. *Afr. J. Biotechnol.* 8(9):1860-1863.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15:473-497.
- Nakano, M.; Niimi, Y.; Kobayashi, D. and Watanabe, A. 1999. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of hybrid tuberous Begonia (Begonia x Tuberhybrida Voss). *Sci. Hortic.* 79(3-4):245-251.
- Nguyen, H. V.; Phan, H. A. and Duong, T. N. 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(3):315-320.
- Pierik, R. L. M. and Tetteroo, F. A. A. 1987. Vegetative propagation of Begonia venosa Skan *in vitro* from inflorescence explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 10:135-142.
- Rosna, M. T.; Nor, A. H. and Asmah, A. 2009. *In vitro* flowering of selected ornamental plants. *Acta Hort.* 881(881):141-146.
- Rout, G. R.; Mohapatra, A. and S. Mohan, J. 2006. A Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnol. Adv.* 24:531-560.

- Shimada, Y.; Mori, G.; Katahara, Y. and Oda, M. 2006. Formation of adventitious buds on leaf pieces cutting of Begonia Tuberhybrida Group. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. 75(4):318-322.
- Shimada, Y.; Mori, G.; Oda, M. and Ishida, G. 2007. Effects of BA and leaf piece orientation on adventitious bud formation in leaf cutting of Begonia Tuberhybrida Group. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. 76(2):157-162.
- Simmonds, J. and Werry, T. 1987. Liquid shake cultures for improved micropropagation of Begonia × hiemalis. Hortic Sci. 22:122-124.
- Takayama, S. and Misawa, M. 1982. Factors affecting differentiation and growth *in vitro* and a mass-propagation scheme for Begonia x hiemalis. Sci. Hortic. 16:65-75.
- Takimoto, A. 1960. Effect of sucrose on flower initiation of Pharbitis nil in aseptic culture. Plant Cell Physiol. 1:241-24.
- Zhang, Y. W.; Yang, C. F.; Gituru, W. R. and Guo, Y. H. 2008. Within-season adjustment of sex expression in females and hermaphrodites of the clonal gynodioecious herb Glechoma longituba (Lamiaceae). Ecol Res. 23:873-881.