



Análisis de la actividad de los reguladores transcripcionales de los genes relacionados a la pigmentación de pétalos del género *Rosa* mediante un modelamiento matemático

Ayala Robalino, Emilia Pamela

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Proaño Tuma, Karina Isabel Ph.D.

18 de marzo del 2021



Document Information

Analyzed document	Análisis de la actividad de los reguladores transcripcionales de los genes relacionados a la pigmentación de pétalos del género Rosa mediante un modelamiento matemático.docx (D98717207)
Submitted	4/14/2021 1:26:00 AM
Submitted by	PROAÑO TUMA KARINA ISABEL
Submitter email	kiproanio@espe.edu.ec
Similarity	1%
Analysis address	kiproanio.espe@analysis.arkund.com

Sources included in the report

SA	CASTILLO-TESIS-URKUND.docx Document CASTILLO-TESIS-URKUND.docx (D80452054)	1
-----------	--	---

Firma



KARINA
ISABEL

.....
Karina Isabel Proaño Tuma, Ph.D.
C.C.: 1707245104



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Análisis de la actividad de los reguladores transcripcionales de los genes relacionados a la pigmentación de pétalos del género *Rosa* mediante un modelamiento matemático**” fue realizado por la señorita **Ayala Robalino, Emilia Pamela** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 18 de marzo de 2021

Firma:



.....

Proaño Tuma, Karina Isabel, Ph.D.

C. C. 1707245104



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Ayala Robalino, Emilia Pamela**, con cédula de ciudadanía n°1725790099, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Análisis de la actividad de los reguladores transcripcionales de los genes relacionados a la pigmentación de pétalos del género *Rosa* mediante un modelamiento matemático** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 18 de marzo de 2021

Firma:

Ayala Robalino, Emilia Pamela

C. C. 1725790099



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Ayala Robalino, Emilia Pamela**, con cédula de ciudadanía n°1725790099, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Análisis de la actividad de los reguladores transcripcionales de los genes relacionados a la pigmentación de pétalos del género *Rosa* mediante un modelamiento matemático en el Repositorio Institucional**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 18 de marzo de 2021

Firma:

Ayala Robalino, Emilia Pamela

C. C. 1725790099

Dedicatoria

A mi familia y amigos,
por su apoyo incondicional a lo largo de esta etapa.

A Diego, mi compañero de vuelos,
quien me motivó y me apoyó incondicionalmente
en buenos y malos momentos.

Emilia Pamela Ayala Robalino

Agradecimientos

A mis padres, Rubén y Mercedes, por ser el pilar fundamental para mi crecimiento y desarrollo tanto personal como profesional. Gracias por creer en mí, también por su cariño y su sacrificio diario para la obtención de esta y muchas más metas en mi vida.

A mis hermanas, Nancy y Gaby por ser mis mayores ejemplos de lucha y perseverancia. Gracias por sus consejos y su apoyo a lo largo de mi vida. Asimismo, por cada momento compartido en las buenas y en las malas.

A mis sobrinos, Nicole, Elián, Jeremy y Joaquín, por ser quienes voltean mi mundo de cabeza, pero a su vez son quienes me inspiran a ser mejor cada día. Gracias por ponerle color a mi vida.

A mi princesa Linda, por ser el rayito de luz en mi vida, me haces feliz cuando el cielo está gris y a Titán por acompañarme a cualquier hora del día en el cuarto de estudio a lo largo de la realización de este proyecto.

A mis mejores amigos desde la escuela y colegio, los incondicionales, los de siempre y mis hermanos: Dome, Kevin, Carlitos, Pame y Gabo, por tanta paciencia y tanto amor. Gracias por la invitación a cada caída y fiesta donde tuve que llegar con la maleta llena de cuadernos, carpetas y/o libros porque tenía que hacer deberes, informes o estudiar, pero ustedes nunca dejaron me dejaron de lado, hasta me ayudaron a recortar y pegar los deberes eternos de Diseño Experimental. Su apoyo en todo momento, me enseñó que una nunca está sola y que las amistades verdaderas y duraderas existen gracias a que los llegué a conocer.

A mis amigos pajareros, Bryan, Gabo, Jona, Eri, Pablito, Morita, Verito, Nathy, entre muchos más, cuya amistad ha sido la más enriquecedora hasta el momento. Gracias por todas las enseñanzas impartidas en cada salida y viaje compartido. También porque su amistad sobrepasó el mundo de las aves y hemos logrado formar una hermandad. A su tiempo, organizaremos muchas pajareadas más porque el cuerpo lo pide.

A mis amigos de la universidad, principalmente a mi personita (Verito), Kriz, Kevito, Vivito, los pulpos (Mauro, Amix, Yoja, Peque, César, Karlita, Dani, Nathy y Paúl) y los weas (Chinita, Gabo, Negro y otros), por todos los momentos compartidos tanto fuera como dentro del aula. Su amistad es de las cosas que más atesoro de mi paso por la universidad.

A Diego, mi mejor amigo, mi novio, mi compañero de vuelos, que me faltarían palabras para agradecerte la infinidad de cosas que has hecho por mí. Gracias por tu amor y apoyo incondicional tanto en malos como en buenos momentos. Gracias por ayudarme a crecer y a mejorar como persona en todo el sentido de la palabra y ser mi equipo. Además, gran parte de este logro fue por toda la ayuda que me brindaste y espero poder recompensarte de la mejor manera posible.

Por último, a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE por las enseñanzas impartidas, pero sobre todo a mi directora de tesis, la Dra. Karina Proaño, por su valioso tiempo, su infinita paciencia y las directrices brindadas en la elaboración de este proyecto de titulación.

Emilia Pamela Ayala Robalino

Índice de contenido

Análisis de la actividad de los reguladores transcripcionales de los genes relacionados a la pigmentación de pétalos del género <i>Rosa</i> mediante un modelamiento matemático.....	1
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría	5
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos.....	7
Índice de contenido	9
Índice de tablas	12
Índice de figuras	13
Índice de ecuaciones.....	15
Listado de abreviaturas	16
Resumen.....	17
Abstract.....	18
Capítulo 1: Introducción.....	19
Planteamiento del problema	19
Justificación del problema.....	20
Objetivos.....	21
Objetivo general	21
Objetivos específicos.....	21

Marco teórico.....	21
Género <i>Rosa</i>	21
Cultivo de Rosas en el Ecuador	22
Importancia Económica de las Rosas.....	23
Principales Pigmentos y Rutas Metabólicas en Rosas.....	24
Flavonoides y Antocianinas	24
Carotenoides.....	26
Regulación génica en el Mejoramiento de Rosas.....	28
Transcriptómica.....	29
Regulación Transcripcional de Genes	30
Modelamiento Matemático Mediante la Ecuación de Hill.....	31
Hipótesis.....	35
Capítulo 2: Materiales y Métodos	36
Participantes	36
Zona de Estudio.....	36
Duración de la Investigación	36
Metodología.....	36
Elaboración de la Base de Datos.....	36
Determinación de la Línea Base.....	37
Determinación de las Enzimas Relacionadas a la Ruta Biosintética.....	37
Determinación de los Factores de Transcripción	38

Modelamiento Matemático.....	38
Capítulo 3: Resultados	40
Base de Datos	40
Determinación de la Línea Base	45
Análisis de las Rutas Biosintéticas.....	47
Determinación de los Factores de Transcripción	57
Modelamiento Matemático	61
Capítulo 4: Discusión.....	70
Principales pigmentos y rutas metabólicas.....	71
Análisis Transcripcional de Genes	75
Modelamiento Matemático	76
Capítulo 5: Conclusiones.....	78
Capítulo 6: Recomendaciones.....	80
Capítulo 7: Bibliografía	81
Capítulo 8: Anexos	88

Índice de tablas

Tabla 1 Número de Datos Documentados sobre Flavonoides, Antocianinas y Carotenoides, en Rosas a partir de la Base de Datos.....	44
Tabla 2 Medias y Desviaciones Estándar de la Concentración de los Metabolitos Representativos por cada Color de la Base de Datos Depurada	45
Tabla 3 Resultados Resumidos de las Pruebas de Tukey.....	46
Tabla 4 Enzimas Principales de las Rutas Biosintéticas en la Síntesis de los Metabolitos Representativos.....	56
Tabla 5 Acción en las Enzimas Principales de las Rutas Metabólicas por Color Representativo del Género <i>Rosa</i>	57
Tabla 6 Datos de las Secuencias Génicas de las Enzimas Principales	58
Tabla 7 Identificación de las Islas CpNpGs de la Región Promotora	59
Tabla 8 Factores de Transcripción Seleccionadas a partir de las Secuencias Motifs	60

Índice de figuras

Figura 1 Estructura General De Los Flavonoides	25
Figura 2 Resumen de la Ruta Biosintética de Flavonoides	26
Figura 3 Estructura General de los Carotenoides	27
Figura 4 Resumen de la Ruta Biosintética de los Carotenoides.....	28
Figura 5 Gráfica de la Ecuación de Hill para la Regulación de un Factor Transcripcional Activador	33
Figura 6 Gráfica de la Ecuación de Hill para la Regulación de un Factor Transcripcional Represor.....	35
Figura 7 Porcentaje de Especies Representativas del Género <i>Rosa</i> de la Base de Datos	41
Figura 8 Porcentaje del Color de Rosas de la Base de Datos.....	42
Figura 9 Porcentaje de metabolitos relacionados a la pigmentación del género <i>Rosa</i> de la Base de Datos	43
Figura 10 Concentraciones de los Metabolitos en Relación al Color según la Línea Base	47
Figura 11 Medias de Concentración de Kaempferol en relación a los Colores Representativos.....	48
Figura 12 Medias de Concentración de Quercetina en relación a los Colores Representativos.....	49
Figura 13 Medias de Concentración de Pelargonidina en relación a los Colores Representativos.....	50
Figura 14 Medias de Concentración de Cianidina en relación a los Colores Representativos.....	51

Figura 15 Medias de Concentración de β -caroteno en relación a los Colores Representativos.....	52
Figura 16 Medias de Concentración de Violaxantina en relación a los Colores	53
Figura 17 Ruta Biosintética de Flavonoides y Antocianinas a partir del Dihidrokaempferol	54
Figura 18 Ruta Biosintética de Carotenoides a partir del γ -caroteno.....	55
Figura 19 Modelo Matemático de los TF para Dihydroflavonol 4-reductasa	62
Figura 20 Modelo Matemático de los TF para Flavonol Sintasa.....	63
Figura 21 Modelo matemático de los TF para Flavonoide 3'-hidroxilasa	65
Figura 22 Modelo matemático de los TF para Licopeno β -Ciclase.....	66
Figura 23 Modelo matemático de los TF para Zeaxantina Epoxidase	69

Índice de ecuaciones

Ecuación 1 Ecuación de Hill para la Regulación de un Factor de Transcripción Activador.....	32
Ecuación 2 Ecuación de Hill para la Regulación de un Factor de Transcripción Represor.....	34
Ecuación 3 Ecuación de Hill utilizada en el Modelamiento Matemático.....	39

Listado de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianzas
ARN	Ácido ribonucleico
CHYB	β -hidroxilasa
CHS	Chalcona sintasa
CHYE	ϵ -hidroxilasa
DFR	Dihidroflavonol 4-reductasa
FLS	Flavonol sintasa
F3'H	Flavonoide 3'-hidroxilasa
FP	Pétalo fresco
GGPP	Geranil geranil pirofosfato
GRN	Redes reguladoras de genes
LCYB	Licopeno β -ciclase
LCYE	Licopeno ϵ -ciclase
mg	Miligramo(s)
mL	Mililitro(s)
mRNA	ARN mensajero
nM	Nanomolar
PSY	Fitoeno sintasa
TF	Factor(es) de transcripción
ZEP	Zeaxantina epoxidasa

Resumen

El género *Rosa* pertenece a la familia de las rosáceas, la cual representa gran interés económico a nivel mundial. Las florícolas desarrollan nuevos cultivares de rosas con atributos florales mejorados cada año, con el fin de satisfacer la alta demanda y el mercado dinámico de la exportación de rosas. El presente proyecto de investigación propone un análisis de la actividad de los reguladores transcripcionales de los genes relacionados a la pigmentación en pétalos del género *Rosa* mediante un modelamiento matemático. A partir de 1 500 datos recolectados en una base de datos, se determinaron los metabolitos representativos: kaempferol y quercetina en flavonoides, pelargonidina y cianidina en antocianinas, β -caroteno y violaxantina en carotenoides. En los análisis estadísticos ($p < 0,05$) sobre las medias de las concentraciones de los metabolitos representativos, se determinó al color blanco como línea base para la generación de nuevos colores, por presentar la menor diferencia significativa. A partir de la línea base y las concentraciones de metabolitos se analizaron las rutas biosintéticas y se seleccionaron las enzimas DFR, FLS, F3'H, LCYB y ZEP, para determinar los inductores encargados de la regulación transcripcional. Del análisis de las regiones promotoras para la regulación transcripcional se obtuvo los factores de transcripción activadores AT1G29160 y AT2G06200 y represores AT1G51600 y AT1G09030. Finalmente, el análisis de la regulación transcripcional se realizó mediante el modelamiento matemático basado en la ecuación de Hill que permite simular las concentraciones de enzima a partir de la concentración de activadores o represores para la obtención de nuevas variedades de colores en rosas.

Palabras claves:

- **GÉNERO ROSA**
- **PIGMENTOS**
- **REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL**
- **MODELAMIENTO MATEMÁTICO**

Abstract

The genus *Rosa* belongs to the Rosaceae family, which has great economic interest worldwide. Floriculture companies develop new rose cultivars with improved floral attributes every year to meet the high demand and dynamic rose export market. The present research project proposes an analysis of the activity of the transcriptional regulators of the genes related to pigmentation in petals of the *Rosa* genus through mathematical modeling. From 1 500 data collected in a database, representative metabolites were determined: kaempferol and quercetin in flavonoids, pelargonidin and cyanidin in anthocyanins, β -carotene and violaxanthin in carotenoids. In the statistical analyses ($p < 0.05$) on the means of the concentrations of the representative metabolites, the white color was determined as the baseline for the generation of new colors, because it presented the smallest significant difference. From the baseline and metabolite concentrations, the biosynthetic pathways were analyzed and the enzymes DFR, FLS, F3'H, LCYB and ZEP were selected to determine the inducers responsible for transcriptional regulation. From the analysis of the promoter regions for transcriptional regulation, the activating transcription factors AT1G29160 and AT2G06200 and repressors AT1G51600 and AT1G09030 were obtained. Finally, the analysis of transcriptional regulation was performed by mathematical modeling based on the Hill equation that allows simulating enzyme concentrations from the concentration of activators or repressors to obtain new color varieties in roses.

Key words:

- **GENUS ROSA**
- **PIGMENTS**
- **TRANSCRIPTIONAL REGULATION**
- **MATHEMATICAL MODELING**

Capítulo 1: Introducción

Planteamiento del problema

La comercialización nacional e internacional de flores y plantas ornamentales se ha convertido en un mercado en aumento, beneficiando a los principales países productores y exportadores de flores naturales como son: Holanda, Colombia y Ecuador (Muñoz, 2020). En el Ecuador, las rosas representan aproximadamente el 75% del porcentaje total de exportaciones de flores (FAO, 2017), rubro que corresponde al 5% del Producto Interno Bruto (PIB) con casi 900 millones de ingresos anuales (Banco Central del Ecuador, 2019).

En relación a la demanda creciente de nuevas variedades de rosas, el mercado a nivel mundial ha exigido a la industria florícola a desarrollar y aplicar nuevas tecnologías que se adapten al cambio del mercado (Gómez & Agustín, 2017), tanto por temporada, preferencia o tendencia (Waliczek, Byrne, & Holeman, 2018). Esta situación ha incentivado la aplicación de la Biotecnología e Ingeniería genética para la creación de variedades de rosas con nuevos colores, mayor número de pétalos, aromas diversos, entre otros (Lyll, 2013).

En el Ecuador se aplican estrategias de reproducción clásicas para desarrollar nuevas líneas de rosas con mayor valor estético y comercial, sin embargo las limitaciones en tiempo y recursos que presentan estas estrategias, han generado una pérdida en la competitividad del producto (Noman, *et al.*, 2017). Se ha implementado ciertas aplicaciones biotecnológicas como el cultivo *in vitro* de plantas para mejorar los tiempos y reducir los costos de producción, así como el uso de plantas resistentes a plagas, para evitar la aplicación de pesticidas y optar por cultivos orgánicos que mejoren la calidad a nivel internacional (Gómez & Agustín, 2017). Sin embargo, no se han desarrollado técnicas que permita mejorar los atributos físicos de las rosas de una manera dirigida. Por lo tanto, es necesario obtener nuevas variedades en menor tiempo y bajo costo para satisfacer la demanda actual de comercialización de rosas a nivel internacional (Hair, 2019).

Justificación del problema

En la floricultura se ha implementado diferentes herramientas biotecnológicas junto con métodos clásicos de reproducción para la creación de nuevos fenotipos de flores (Katsumoto, *et al.*, 2007). Generalmente, estas técnicas han consistido en la mejora del color floral, la fragancia, la resistencia a enfermedades y patógenos, mayor altura de tallo y larga duración de vida en el florero (Kawamura, Hibrand-Saint, Thouroude, Jeauffre, & Foucher, 2015).

En rosas, se ha determinado que el atributo con mayor relevancia económica es el color de los botones florales. Esta es la principal característica de atracción al consumidor y por lo tanto, el campo de investigación más estudiado al momento de generar nuevas variedades (Kawamura, Hibrand-Saint, Thouroude, Jeauffre, & Foucher, 2015). Los principales pigmentos responsables del atractivo de las rosas son las antocianinas, los flavonoides y los carotenoides. Las antocianinas son los metabolitos relacionados con los tonos rojizos a naranjas, los flavonoides están encargados de las tonalidades del blanco al amarillo pálido y los carotenoides de los amarillos intensos al naranja claro (Wan, *et al.*, 2019).

La coloración de los botones florales están relacionados con la síntesis y variación de los pigmentos provenientes de diferentes rutas biosintéticas (Noman, *et al.*, 2017). En rosas, los últimos avances en biología molecular han permitido la regulación de genes de la biosíntesis de los principales pigmentos, como es el caso de la variedad morada que existe en la actualidad. Existen estudios que se basan en la sobreexpresión de genes de metabolitos heterólogos o el silenciamiento de genes endógenos, con el fin de variar la concentración de los pigmentos y poder obtener nuevas variedades con colores únicos (Katsumoto, *et al.*, 2007).

Por lo mencionado anteriormente, el presente trabajo de investigación plantea el análisis bioinformático de la actividad de los reguladores transcripcionales de los genes relacionados a la pigmentación de pétalos del género *Rosa*. Este análisis se realizará mediante

un modelamiento matemático, con el objetivo de generar una amplia gama de variedades con diversos colores de rosas y así crear un producto competitivo en el mercado internacional.

Objetivos

Objetivo general

Analizar la actividad de los reguladores transcripcionales de los genes relacionados a la pigmentación de pétalos del género *Rosa* mediante un modelamiento matemático.

Objetivos específicos

- Relacionar la coloración de los pétalos del género *Rosa* con la concentración de metabolitos encargados de la pigmentación, según datos bibliográficos.
- Identificar los puntos convergentes de los genes y las rutas metabólicas de biosíntesis de metabolitos responsables de la coloración de los pétalos del género *Rosa*.
- Realizar un análisis bioinformático de los promotores y los reguladores transcripcionales de los genes responsables de la coloración de los pétalos del género *Rosa*.
- Determinar un modelo matemático de los genes responsables de la coloración de los pétalos del género *Rosa* y sus reguladores transcripcionales.

Marco teórico

Género *Rosa*

El género *Rosa* pertenece a la familia de las rosáceas. Este género comprende alrededor de 150 a 200 especies ampliamente distribuidas en los hábitats templados y subtropicales del hemisferio norte (Fougère-Danezan, Joly, Bruneau, Gao, & Zhang, 2015). Los registros fósiles determinan que las rosas existían hace 35 millones de años y la domesticación empezó hace 5 mil años en China y Europa (Waliczek, Byrne, & Holeman, 2018). Las rosas se han cultivado como plantas de jardín y como flores cortadas. Las rosas han sido ampliamente utilizadas en la cosmetología, la alimentación y en cultivos medicinales tradicionales (Qi, *et al.*,

2018). El “cultivo moderno de rosas” contiene a más de 35 000 cultivares diferentes de rosas generadas por hibridaciones de la industria florícola y cada año se generan nuevas variedades (Carrión, 2018).

La rosa es un arbusto leñoso, espinoso y perenne, compuesto por dos partes: la subterránea donde se encuentra la raíz y la parte aérea comprendida por tallo, hojas y flores (Salazar, 2017). La rosa posee una raíz profunda y pivotante, el tallo es largo y varía según la especie entre 10 cm a 110 cm, con un diámetro de 0,50 a 0,70 cm. La hoja tiene una superficie lisa y normalmente compuesta de folíolos. Las flores multicolores son regulares, presentan entre 25 a 40 pétalos en cada una y están distribuidos en forma de espiral. El fruto anaranjado es una baya carnosa contenida por numerosos y compactos aquenios (Carrión, 2018).

Cultivo de Rosas en el Ecuador

El cultivo de rosas requiere de condiciones climáticas y ambientales como: (1) temperatura de crecimiento entre 17 a 25°C, (2) exposición a radiación solar entre 5 a 6 horas, (3) humedad relativa del invernadero entre 60-70%, (4) niveles de 1 200 ppm de CO₂, (5) suelo formado por elementos finos superior al 75% y elementos gruesos menor al 50% y (6) pH del suelo cercano a 6 (Flores, 2015). Las cualidades deseadas en las flores cortadas según las normativas internacionales sugieren lo siguiente: (1) tallo largo y rígido entre 50 a 70 cm, (2) follaje verde brillante, (3) tiempo largo de floración y de vida en el florero y (4) resistencia a enfermedades y a la humedad (Reyes, 2016).

El cultivo de rosas en el Ecuador inició en el siglo XIX y ha alcanzado prestigio y reconocimiento a nivel mundial (Guallasamín, 2017), pues factores como: las condiciones climáticas favorables, la altitud en la que se encuentran los invernaderos (sobre 2 500 m.s.n.m), el suelo enriquecido, entre otros, permiten el desarrollo diario de esta actividad a diferencia de otros países (Hair, 2019). En el Ecuador existen más de 5 000 hectáreas destinadas al cultivo de rosas (Guallasamín, 2017). Las aproximadamente 1000 fincas dedicadas a la exportación

de rosas están ubicadas en las provincias de Pichincha (77%), Cotopaxi (12%) y en distintas provincias de la Costa (11%) (Carrión, 2018).

La calidad de la rosa ecuatoriana es conocida por su tiempo de vida útil en el florero, su resistencia a la humedad, el largo y ancho de sus tallos, la cantidad de sus pétalos y su amplia variedad de colores (Carrión, 2018). Estas características han permitido cumplir con las normativas estándar y han aprobado el ingreso al mercado internacional, hasta convertirse en el tercer país exportador mundial de flores (FAO, 2017).

Importancia Económica de las Rosas

La comercialización de la flor cortada tuvo trascendencia a partir de la Segunda Guerra Mundial, donde se produjo una evolución en la producción, almacenamiento, clasificación y distribución del material vegetal, debido a las nuevas técnicas y tecnologías que se aplican hasta hoy en día (Egas, 2017). En la actualidad, las principales flores cortadas de exportación son: rosas, claveles, lirios, crisantemos y gérbas. Entre las flores anteriormente mencionadas, el género *Rosa* es considerada como la familia económicamente más importante del mundo a partir del 2005 (Waliczek, Byrne, & Holeman, 2018).

La exportación de rosas en el Ecuador ha tenido gran incidencia en la economía ecuatoriana desde la década de los 90's (Reyes, 2016). A lo largo de estos últimos 30 años se han diversificado destinos de exportación como son: Estados Unidos (45,3%), Unión Europea (20,2%), Rusia (14,7%), Canadá (2,5%), Ucrania (2,4%), entre otros (14,9%). En el 2019, las exportaciones de rosas representaron 649 millones de ingresos para el sector florícola ecuatoriano con el 74 % del total exportado de flores cortadas. Gran parte de las exportaciones de flores se realizaron en febrero (13 % del total), debido a la demanda por San Valentín (EXPOFLORES, 2019).

Los principales consumidores de rosas, Estados Unidos y la Unión Europea, afirman que son atraídos por aquellas flores que presentan nuevos colores y fragancias. (Waliczek,

Byrne, & Holeman, 2018). El Ecuador posee alrededor de 400 variedades de rosas registradas con amplia variedad de gama de colores, siendo las más demandadas las rosas: rojas, blancas, rosadas y bicolors (Gómez & Agustín, 2017). Los floricultores ecuatorianos aplican estrategias de reproducción clásicas como la hibridación para la creación de nuevas variedades y adaptarse a las exigencias de este mercado dinámico (Noman, *et al.*, 2017).

Principales Pigmentos y Rutas Metabólicas en Rosas

El color de las flores juega un papel fundamental en la reproducción sexual de las plantas al atraer polinizadores como insectos y aves (Katsumoto, *et al.*, 2007). La coloración de los pétalos depende de compuestos biosintetizados por las plantas, denominados metabolitos secundarios (Wan, *et al.*, 2019).

Los metabolitos secundarios son producidos dependiendo el tipo de célula vegetal, etapa de desarrollo de la planta y/o estímulos ambientales. La biosíntesis de los metabolitos secundarios comienza a partir de rutas básicas como la glucólisis o la vía del ácido siquímico. La producción de metabolitos secundarios se regulan a nivel bioquímico y molecular dependiendo de las necesidades de las plantas para evitar la pérdida de energía en síntesis innecesarias (Patra, Schluttenhofer, Wu, Sitakanta, & Yuan, 2013).

Entre los principales metabolitos secundarios relacionados a los pigmentos y co-pigmentos de los pétalos se encuentran los flavonoides, antocianinas, carotenoides y betalainas (Katsumoto, *et al.*, 2007). En el caso de las rosas, las betalainas no están presentes en la pigmentación de pétalos (Stolker, 2010).

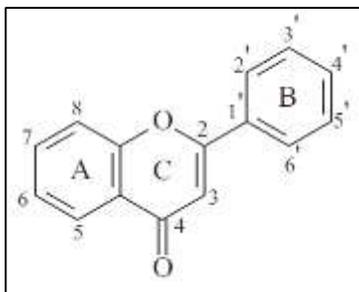
Flavonoides y Antocianinas

Los flavonoides es el grupo de metabolitos secundarios formado de fenilpropanoides divididos en antocianinas, flavonoles, flavonas, entre otros compuestos (Wan, *et al.*, 2019). Los flavonoides se conocen también como compuestos fenólicos diaril-propánicos, por su

estructura C₆-C₃-C₆ ya que se componen de dos anillos de benceno (denominados anillo A y anillo B) y están conectados por una cadena de 3 carbonos (Fig. 1).

Figura 1.

Estructura General De Los Flavonoides



Nota: La estructura C₆-C₃-C₆ está compuesta por los anillos bencénicos A y B, conectados por una cadena de 3 carbonos que forma el anillo C. Fuente: Mohammad, *et al.* (2018)

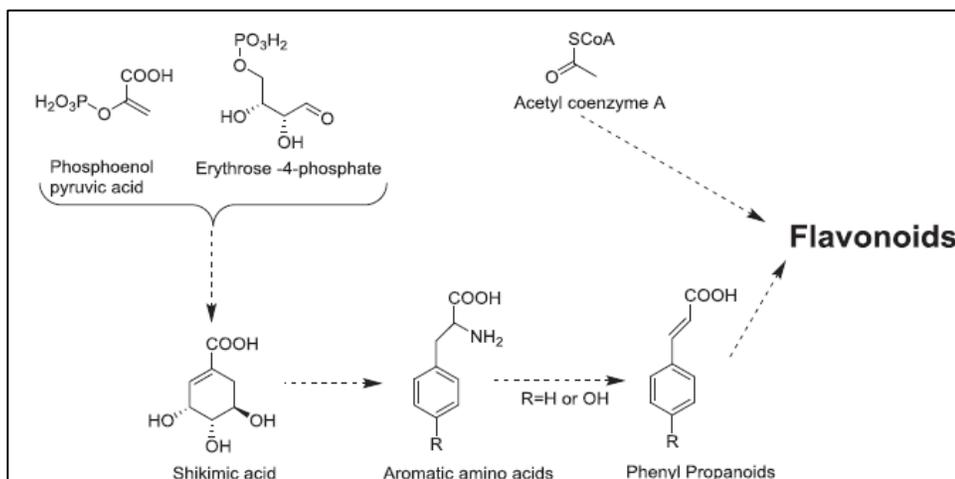
Los flavonoides a más de brindar color en los pétalos, tienen acción antioxidante, antimicrobiana, protección de rayos UV, entre otros (Noman, *et al.*, 2017). Estos pigmentos se acumulan en las vacuolas de los pétalos por su composición hidrofílica (Stolker, 2010). Estos compuestos fenólicos contribuyen a una amplia gama de colores como son: amarillo pálido, naranja, rojo, magenta, violeta y azul. Las flores de color blanco y amarillo pálido acumulan gran cantidad de flavonoles, a diferencia de las rosas rojas, naranjas y rosadas que poseen gran cantidad de antocianinas (Tanaka, *et al.*, 2011). Los principales flavonoides en rosas son los flavonoles (kaempferol y quercetina) y las antocianinas (pelargonina, cianina y peonina) (Stolker, 2010).

La estructura de estos compuestos tiene características similares debido a que su precursor común es la chalcona (Stolker, 2010). El anillo A es biosintetizado por la ruta de los

policétidos, mientras que el anillo B y la unidad C₃ provienen de la ruta del ácido siquímico. como se ve en la Figura 2 (Mohammad, *et al.*, 2018).

Figura 2.

Resumen de la Ruta Biosintética de Flavonoides



Nota: El resumen de la ruta biosintética de flavonoides afirma que los flavonoides provienen de la ruta de los policétidos (arriba-derecha) y de la ruta del ácido siquímico (abajo-izquierda) Fuente: Mohammad, *et al.* (2018)

Los flavonoides se encuentran como agliconas libres o unidas a glucósidos. La adición de una unidad de azúcar a un compuesto fenólico da como resultado un aumento de la polaridad del compuesto. Generalmente, las unidades de azúcar se unen como derivado de O-glicósido en C-3. Las formas unidas a glucósidos son las formas más comunes de flavonoles y flavonas (Mohammad, *et al.*, 2018).

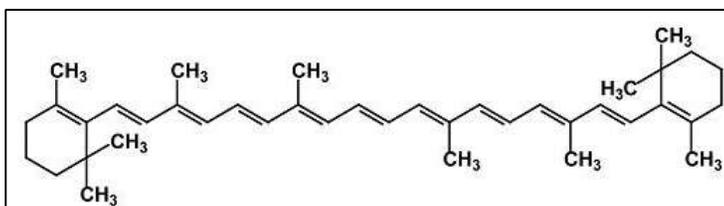
Carotenoides

Los carotenoides están formados por ocho moléculas de isopreno y su estructura es C₄₀ (Figura 3) (Wan, *et al.*, 2019). Estos compuestos se dividen en xantófilas, que son aquellas moléculas que tienen oxígeno en su estructura y carotenos, que no poseen oxígeno. A más de

ser pigmentos accesorios para atraer polinizadores, recolectan la luz solar para la fotosíntesis y actúan como fotoprotectores para que las plantas se adapten al estrés lumínico (Lu & Li, 2008).

Figura 3.

Estructura General de los Carotenoides



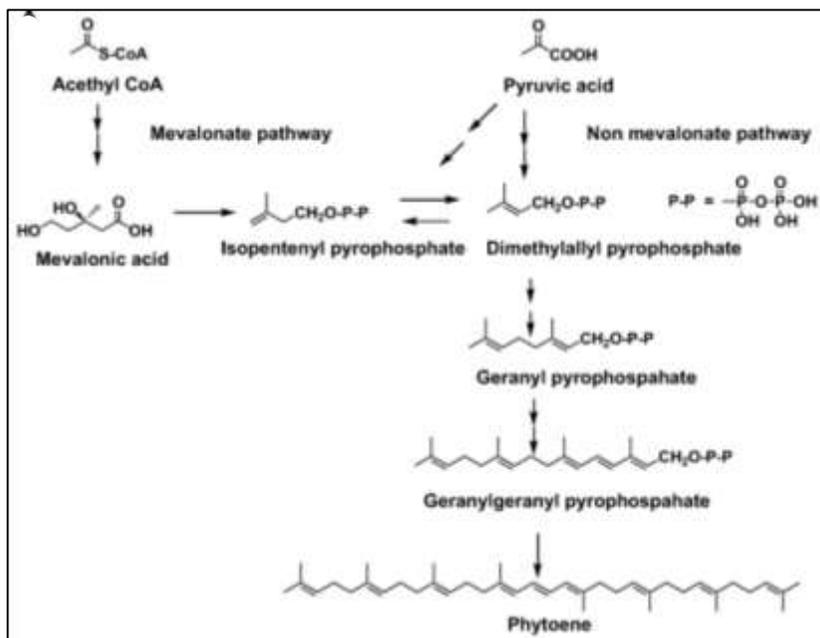
Nota: La estructura general de los carotenoides está formado por ocho moléculas de isopreno. Fuente: Lu & Li (2008).

Los carotenoides de las rosas son pigmentos hidrofóbicos que se localizan en los plastidios de los pétalos. Estos metabolitos secundarios dan las tonalidades de amarillo, naranja y rojo intenso en algunas flores (Stolker, 2010). Las flores de color amarillo pálido a intenso acumulan principalmente xantófilas, mientras que las flores de rojo intenso en su mayoría contienen gran cantidad de astaxantina. Sin embargo, la concentración de carotenoides en rosas es muy baja a comparación a otras flores (Wan, *et al.*, 2019).

La producción de estos metabolitos inicia con la síntesis del bloque de construcción de 5 carbonos, pirofosfato de isopentenilo (IPP) y el isómero alílico dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Se añaden tres moléculas de IPP a DMAPP mediante geranylgeranyl difosfato (GGDP) sintasa (GGPS) para producir unidades C₂₀ (GGDP). La condensación de dos moléculas de GGDP por la fitoeno sintasa (PSY) da origen al fitoeno, precursor de los carotenoides, como se observa en la Figura 4 (Lu & Li, 2008).

Figura 4.

Resumen de la Ruta Biosintética de los Carotenoides



Nota: La ruta biosintética de los carotenoides sintetiza fitoeno, precursor general de todos los tipos de carotenoides. Fuente: Lu & Li (2008).

Regulación génica en el Mejoramiento de Rosas

La resistencia al estrés biótico y abiótico, la floración recurrente, el tiempo de floración, la morfogénesis de los botones florales, el color y aroma de la flor, son características económicas importantes en el mejoramiento moderno de rosas (Qi, *et al.*, 2018). El color de las rosas es el principal atractivo desde el punto de vista del consumidor, por lo que los estudios actuales se basan en el entendimiento a nivel bioquímico y bioinformático de las rutas biosintéticas de los principales pigmentos (Katsumoto, *et al.*, 2007).

En los últimos 20 años, los avances tecnológicos han permitido el aislamiento de genes que codifican enzimas que actúan en la vía metabólica, la regulación de la expresión génica con su modelamiento *in silico* y el establecimiento de un sistema de transformación eficiente en

modelos vegetales. Estos avances han sido aplicados en la floricultura para la modificación de las rutas biosintéticas de los principales pigmentos florales y así obtener nuevas variedades de rosas (Tanaka, *et al.*, 2011).

Transcriptómica

La tecnología de la transcriptómica estudia el transcriptoma de un organismo, así como la suma de todas las transcripciones de ARN en un tiempo determinado (Lowe, Shirley, Bleackley, Dolan, & Shafee, 2017). Esta técnica estudia de manera cualitativa los perfiles de transcripción de genes, para determinar qué genes se expresan o no. Además, puede expresarse de manera cuantitativa para medir cambios de concentraciones en los niveles de transcripción de genes (Hubank, 2004). Las aplicaciones pueden ser diversas, puede utilizarse para el diagnóstico de enfermedades, identificar la respuesta de un organismo al ambiente, identificar las funciones de los genes y su respuesta ante fenotipos particulares o la sobreexpresión o represión de los mismos. Adicionalmente, sirve para el estudio de las funciones de ARN no codificante, entre otras (Lowe, Shirley, Bleackley, Dolan, & Shafee, 2017).

El genoma de la rosa comprende 36 377 genes codificadores de proteínas y 3 971 ARN largos no codificantes (Raymond, y otros, 2018). El primer atlas de expresión génica de *R. hybrida*, se construyó utilizando microarrays con aproximadamente 350 secuencias de ADN y ARNm, el cual más tarde se complementarían con aproximadamente 4 800 secuencias de *R. chinensis*, *R. wichuriana* y *R. hybrida*. En la actualidad, existe una base de datos más completa que contiene aproximadamente 80 714 grupos de transcripciones para *R. chinensis* "Old Blush" a partir de 13 tejidos en diferentes etapas de desarrollo o bajo diferentes tensiones abióticas y bióticas. Pese a la importancia del uso de esta técnica y que varios estudios han promovido significativamente la comprensión de la biología de las rosas, la calidad de los transcriptomas en las bases de datos es relativamente pobre (valor de N50 bajo) y tiene varios datos

insuficientes. Sin embargo, la investigación en esta área de conocimiento sigue en auge dada la importancia económica de las rosas a nivel mundial (Li, y otros, 2018).

Regulación Transcripcional de Genes

La regulación transcripcional de genes es un proceso celular que regula la actividad genética. La producción y acumulación adecuada de metabolitos secundarios se encuentran estrictamente controlados por una red compleja de proteínas reguladoras conocidas, como factores de transcripción (TF). Los factores de transcripción son proteínas de unión en sitios específicos de ADN y reconocen secuencias reguladoras *cis* específicas en los promotores de genes diana y activan o reprimen su expresión en respuesta a señales de desarrollo y/o ambientales. Algunos TF no se unen directamente al ADN, pero interactúan con otros cofactores para formar complejos y así regular la expresión de los genes diana (Patra, Schluttenhofer, Wu, Sitakanta, & Yuan, 2013).

Las funciones esenciales de los carotenoides en la fotosíntesis, la morfogénesis y el desarrollo de las plantas sugieren que la biosíntesis está regulada de forma coordinada con otros procesos como la biogénesis de los plastidios, la floración y el desarrollo de los frutos. La biosíntesis de los flavonoides generalmente está regulada en la etapa de floración de la planta, ya sea para la producción de aromas o la pigmentación del botón floral para la atracción de los polinizadores (Lu & Li, 2008).

Las plantas adoptan mecanismos naturales para cambiar el color de sus flores y atraer a más polinizadores. Estos mecanismos como la glicosilación, acilación y metilación de flavonoides y antocianidinas son las fuentes primarias para la variedad estructural, por lo tanto, son los mecanismos más estudiados para su modificación. La glicosilación y metilación en antocianinas hace que el color se vuelva ligeramente más rojo, mientras que la acilación aromática desplaza sus máximos de absorción hacia una longitud de onda más larga (Tanaka, *et al.*, 2011).

La transformación eficiente para el cambio de coloración de flores se basa en el conocimiento de la base molecular de las rutas biosintéticas. Los carotenoides son importantes para la pigmentación en rosas, pero existen pocos casos exitosos de la modificación del color del botón floral mediante la regulación de esta ruta biosintética. Por otro lado, los flavonoides son los metabolitos secundarios vegetales mejor estudiados. La ruta biosintética y la regulación de los flavonoides han presentado éxito en la modificación de la pigmentación floral. En el grupo de los flavonoides se encuentran las antocianinas como principales pigmentos, las cuales contribuyen a una variedad de colores como el rojo, el rosa y el azul. Recientemente, a partir de los flavonoides se han utilizado compuestos incoloros o de colores tenues, como las chalconas, auronas, flavonas y flavonoles. Las chalconas y auronas se han utilizado con éxito para producir flores amarillas con diferentes tonalidades (Nishihara & Nakatsuka, 2010).

Modelamiento Matemático Mediante la Ecuación de Hill

El desarrollo de algoritmos para inferir en la regulación de genes basados en datos de expresión es un tema importante en la investigación bioinformática. La validación de estos algoritmos requiere conjuntos de referencia a partir de distintas bases de datos. En la actualidad, existe una clara necesidad de generar conjuntos de datos sintéticos bien caracterizados. Por lo tanto, los algoritmos desarrollados deben permitir el aprendizaje de forma rápida y reproducible a nivel de laboratorio para la implementación o mejoramiento de nuevos productos comerciales (Ay & Arnosti, 2011).

Los modelos de regulación genética emplean enfoques estadísticos o analíticos. Ambos enfoques pueden ser muy eficaces para proporcionar conocimientos no intuitivos sobre los sistemas reguladores de genes. Entre los modelos más estudiados sobre regulación genética se encuentra la ecuación clásica de Hill, la cual es la forma más sencilla de representar una respuesta transcripcional (Van den Bulcke, y otros, 2007).

Al ser la regulación génica una red de conexiones no lineales, la ecuación de Hill describe las respuestas sigmoideas independientemente de los detalles de los mecanismos subyacentes. Además, este modelo matemático permite dilucidar los tres tipos de eventos que pueden presentar los factores de transcripción: (i) unión funcional específica a las regiones *cis*-reguladoras (es decir, control de la transcripción), (ii) unión específica pero no funcional (es decir, a sitios de ADN que tienen secuencias similares a las de los sitios de unión afines) y (iii) unión no funcional inespecífica (Bottani & Veitia, 2008).

En la regulación transcripcional, la función de Hill describe cómo la tasa de producción de un gen depende de la concentración del factor de transcripción, ya sea activador o represor. Para un activador, la función Hill es una función creciente con concentración de activador activo X^* . La tasa de producción aumenta desde cero y alcanza la tasa de producción máxima en forma sigmoidea (Ecuación 1).

Ecuación 1

Ecuación de Hill para Regulación de un Factor de Transcripción Activador

$$f(X^*) = \frac{\beta_{max} \cdot X^{*n}}{K^n + X^{*n}}$$

Donde:

- β_{max} , es la tasa de producción máxima
- n , es el coeficiente de Hill
- K , es el coeficiente de activación

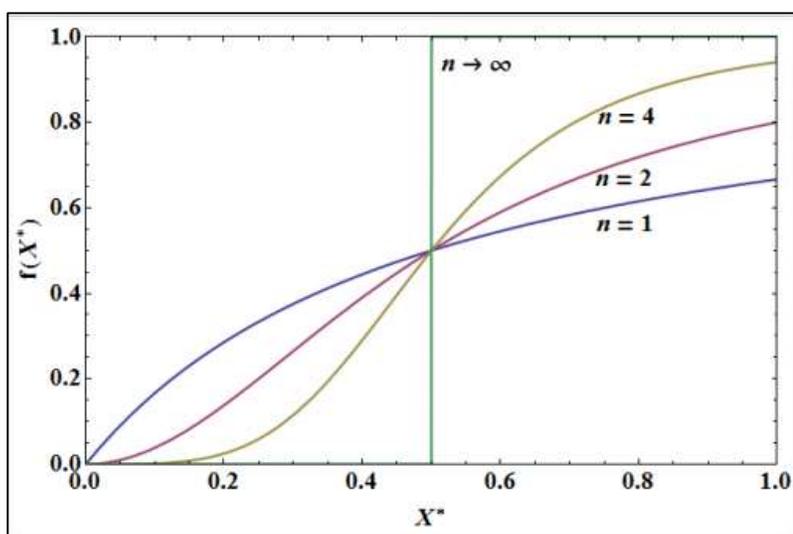
β_{max} es la tasa de producción máxima del complejo promotor-factor de transcripción.

Si la concentración de activador X^* es igual al coeficiente de activación K , la función Hill

alcanza la mitad del punto máximo. El valor de K depende de la fuerza del promotor, así como del aumento de la afinidad a través de factores de transcripción. La representación gráfica se observa en la Figura 5.

Figura 5

Gráfica de la Ecuación de Hill para la Regulación de un Factor Transcripcional Activador



Nota: La gráfica general de la ecuación de Hill para activadores presenta los siguientes parámetros: $\beta_{max}=1$, $K=0.5$, $X \in [0,1]$, $n=1,2,4,\infty$. Fuente: (Alon, 2019).

Los valores típicos para el coeficiente de Hill son del 1 al 4, ya que cifras mayores o si $n \rightarrow \infty$, la gráfica tiende a convertirse en una línea vertical (Alon, 2019). En cambio, la ecuación de Hill se comporta de diferente manera para los represores, es decir la función disminuye con la concentración de represor activo X^* (Ecuación 2):

Ecuación 2

Ecuación de Hill para Regulación de un Factor de Transcripción Represor

$$f(X^*) = \frac{\beta_{max}}{1 + (X^*/K)^n}$$

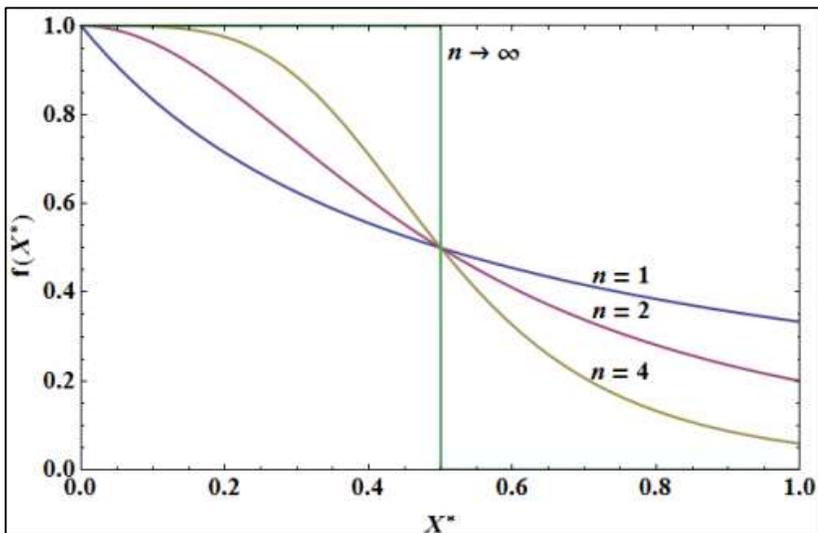
Donde:

- β_{max} , es la tasa de producción máxima
- n , es el coeficiente de Hill
- K , es el coeficiente de represión

La representación gráfica correspondiente se observa en la Figura 6. Se afirma que cuando exista más concentración de represor disponible, mayor será la probabilidad de que un represor se una al sitio del operador, por lo que el nivel de expresión se reprime cada vez más al aumentar los niveles de represor. La represión media ocurre cuando la concentración de represor activo es igual al coeficiente de represión $X^* = K$ (Alon, 2019).

Figura 6

Gráfica de la Ecuación de Hill para la Regulación de un Factor Transcripcional Represor



Nota: La gráfica general de la ecuación de Hill para activadores presenta los siguientes parámetros: $\beta_{max}=1$, $K=0.5$, $X \in [0,1]$, $n=1,2,4,\infty$. Fuente: (Alon, 2019).

Hipótesis

El análisis de los reguladores transcripcionales permite generar un modelo matemático para relacionar la pigmentación de pétalos del género *Rosa* con los metabolitos secundarios.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

Participantes

El presente trabajo de investigación fue realizado por Emilia Pamela Ayala Robalino egresada de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, con la tutoría de la Dra. Karina Proaño Ph.D. jefa del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE. El financiamiento de este proyecto de investigación estuvo a cargo del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

Zona de Estudio

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE del campus ubicado en Sangolquí, cantón Rumiñahui, Provincia de Pichincha en la Av. General Rumiñahui S/N y calle Ambato. (Latitud: 0°18'53"S, Longitud: 78°26'36"O).

Duración de la Investigación

El tiempo de duración de este proyecto de investigación fue aproximadamente de un periodo académico, es decir, el proyecto inició en noviembre del 2020 y se finalizó en marzo del 2021.

Metodología

Elaboración de la Base de Datos

La base de datos se desarrolló utilizando bibliografía científica como publicaciones indexadas, tesis de grado y libros. Las plataformas digitales donde se realizó la búsqueda bibliográfica fueron PubMed, Scielo, Web of Science y Google Scholar. Las palabras claves utilizadas fueron: roses, pigments, flavonoids, anthocyanins, carotenoids, quantification and determination. La base de datos se realizó tomando en cuenta datos cualitativos y cuantitativos en base a especie de rosa, variedad, coloración en pétalos y la concentración de flavonoides,

antocianinas y carotenoides. Las concentraciones de los metabolitos solamente se consideraron en etapa de florecimiento S4 y S5.

En primer lugar, se unificó las unidades de los datos cuantitativos convirtiendo las concentraciones de los metabolitos a mg de metabolito/mL de extracto de pétalo fresco [mg/mL FP]. A continuación, se contabilizaron los metabolitos por subgrupos sin tomar en cuenta el sitio de glicosilación o metilación. Se seleccionaron los dos metabolitos más representativos de cada grupo de pigmentos y se elaboró una base de datos depurada y clasificada por color para los siguientes análisis.

Determinación de la Línea Base

La línea base se refiere al color del cual se partiría para modificar las rutas biosintéticas para la obtención de los demás colores, es decir, se determinó al color que presenta menor diferencia en las concentraciones de los metabolitos representativos. Se determinó la línea base, mediante el análisis inferencial de pruebas estadísticas realizadas en el programa estadístico computacional R. Se calculó las medidas centrales de las concentraciones de metabolitos por color y se empleó un análisis de varianzas (ANOVA) Por otro lado, se aplicó el método de Tukey para la comparación múltiple entre los colores. Las diferencias significativas se determinaron por un nivel de confianza al 95%, es decir $p < 0.05$. Se realizó un análisis inferencial para la selección del color que hace referencia a la línea base según los resultados obtenidos del estudio estadístico.

Determinación de las Enzimas Relacionadas a la Ruta Biosintética

En esta sección se realizó una tabla donde se relacionan las concentraciones de metabolitos comprendidas en rangos por cada color principal. Se procedió a buscar la ruta biosintética con el software bioinformático KEGG Pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) tanto para flavonoides y antocianinas, que comparten la misma vía, como para carotenoides. Se analizó la síntesis de cada metabolito a partir del último precursor,

determinando las enzimas más relevantes en la biosíntesis de cada metabolito. En este análisis, se consideró la concentración final del metabolito por cada color en comparación a la línea base, para determinar la actividad enzimática que se requiere según cada color.

Determinación de los Factores de Transcripción

Para la determinación de los factores de transcripción, se buscó la secuencia del gen de cada enzima seleccionada en el proceso anterior con el software del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Se identificó el punto de inicio de la transcripción en cada secuencia y se seleccionaron aproximadamente 10 000 nucleótidos anteriores al extremo 5'. Las nuevas secuencias descargadas en formato FASTA fueron analizadas en el software bioinformático Plant Promoter Analysis Navigator (PlantPan 3.0) para el reconocimiento de las islas CpNpGs. A partir de esta identificación, se seleccionaron 1 000 nucleótidos anteriores y se colocaron en formato FASTA. La secuencia de 1 000 nucleótidos, reconocida como región promotora fue insertada en el software PlantPan 3.0, para el análisis del promotor a partir de la base de datos de *Arabidopsis thaliana*. En este análisis, se escogió diferentes motifs para la selección de un factor de transcripción activador y otro represor en cada gen. Los parámetros de selección de los factores de transcripción consistieron en valores cercanos a 1 en la sección de "Similar Score" y con suficiente información bibliográfica.

Modelamiento Matemático

Para determinar el modelo matemático que relaciona los reguladores transcripcionales con la concentración de enzima para la biosíntesis de metabolito, se aplicó la siguiente ecuación de Hill (Ecuación 3).

Ecuación 3

Ecuación de Hill utilizada en el Modelamiento Matemático

$$[ENZIMA] = \frac{\alpha_{pENZ}}{d_{OUT}} \left(\beta_{opENZ} \pm \frac{(1 - \beta_{opENZ})[TF]^n}{(K_{dpTF})^n + [TF]^n} \right)$$

Donde:

- $[Enzima]$, es la concentración de enzima a partir de la concentración del factor de transcripción
- α_{pENZ} , es la tasa de síntesis enzimática
- d_{OUT} , es la tasa de degradación transcripcional
- β_{opENZ} , es la expresión basal
- $[TF]$, es la concentración del factor de transcripción
- K_{dpTF} , es la constante de disociación del factor de transcripción
- n , es el coeficiente de Hill
- \pm , signo positivo en caso de utilizar activador o negativo para represor (Trabelsi, Koch, & Faulon, 2018).

Las constantes para el modelo matemático fueron recolectadas a partir de la base de datos de BioNumbers y artículos científicos. Los parámetros utilizados para la obtención de las constantes fueron de *Arabidopsis thaliana* en condiciones normales. Finalmente, la simulación del modelamiento matemático con los datos generados a partir de la base de datos, se realizó en el programa R para la representación gráfica correspondiente a cada enzima.

Capítulo 3: Resultados

Base de Datos

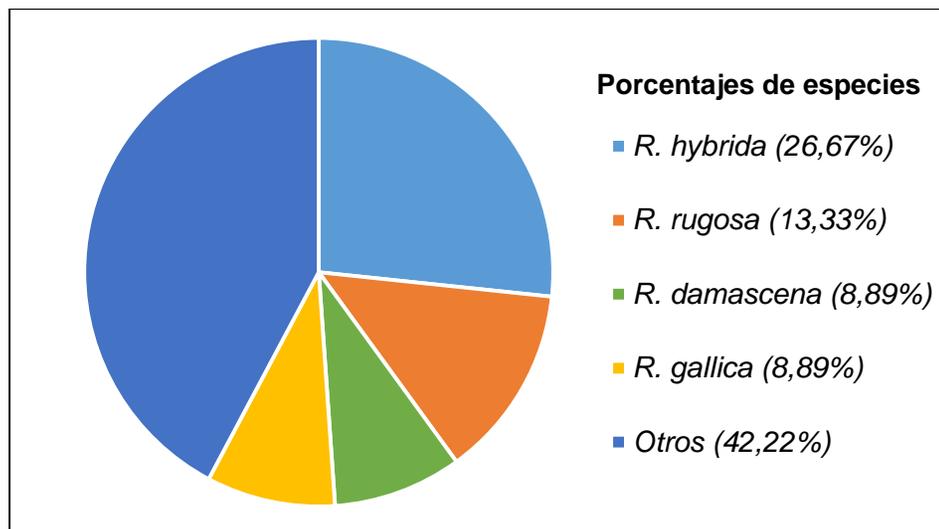
La base de datos se desarrolló a partir de 25 documentos científicos. Los documentos se seleccionaron de la búsqueda de información en base a los metabolitos relacionados a la pigmentación de los pétalos de rosas. La base de datos contempla documentos científicos desde el año 2005 hasta el año 2020 (Anexo 1).

La información recopilada en estos documentos sobre los metabolitos relacionados a la pigmentación del género *Rosa* y su concentración, supera los 1 500 datos (datos no presentados), por lo que en esta investigación se analizará únicamente los datos más representativos de cada grupo de pigmentos.

En estos documentos se encontró aproximadamente 100 variedades distintas de rosas pertenecientes a un total de 19 especies. Los resultados muestran que las especies de rosas más representativas en este estudio son: *R. hybrida* con 26,67%, *R. rugosa* con 13,33%, *R. damascena* y *R. gallica* con 8,89% cada una. En la Figura 7 se puede observar gráficamente los porcentajes de estas especies. En los datos denominados otros, se agrupan especies de rosas con un porcentaje cercano al 1% (*R. canina*, *R. glauca*, *R. multiflora*, *R. acicularis*, *R. bourboniana*, *R. brunonii*, *R. centifolia*, *R. davurica*, *R. gentileana*, *R. maikwai*, *R. micrantha*, *R. rubiginosa*, *R. sempervirens*, *R. simsii*, *R. xanthina*).

Figura 7

Porcentaje de Especies Representativas del Género Rosa de la Base de Datos

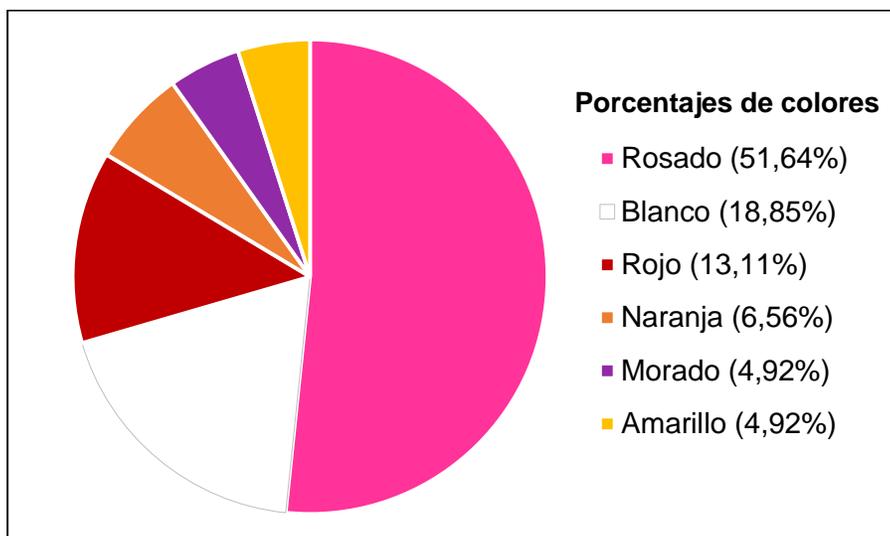


Nota: La gráfica presenta los porcentajes de especies de rosas a partir de un total de 45 datos pertenecientes a 19 especies de este género. Elaborado por Ayala, E. (2021).

Los colores más representativos de las rosas que sobresalen en el análisis de los 122 datos de coloración son el rosado con 51,64%, el blanco con 18,85%, el rojo con 13,11%, el naranja con 6,56%, el morado con 4,92% y amarillo con 4,92%. Las rosas que presentan variedades bicolors no se consideraron en el análisis por presentar un porcentaje menor al 1%. En la figura 8 se puede observar el porcentaje del color de estas rosas.

Figura 8

Porcentaje del Color de Rosas de la Base de Datos

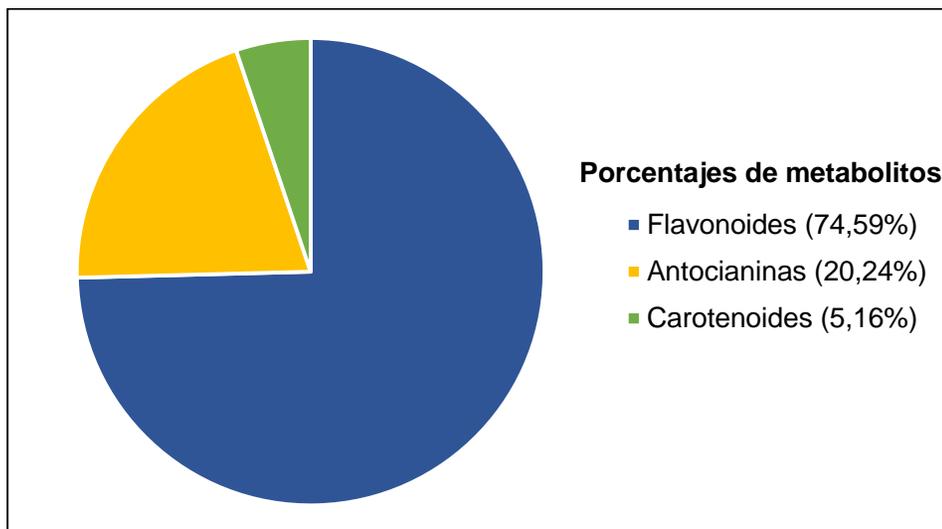


Nota: La gráfica presenta los porcentajes de los colores de rosas analizados a partir de 122 datos de coloración de la base de datos. Elaborado por Ayala, E. (2021).

Los 1 500 datos encontrados de los metabolitos relacionados a la pigmentación del género *Rosa*, se clasificaron en los tres principales grupos de metabolitos: flavonoides, antocianinas y carotenoides. Los resultados evidenciaron que 1098 datos pertenecen a flavonoides (74,59%), 208 a las antocianinas (20,24%) y 76 a carotenoides (5,17%) como se observa en la figura 9.

Figura 9

Porcentaje de metabolitos relacionados a la pigmentación del género Rosa de la Base de Datos



Nota: El análisis se realizó a partir de un total 1 500 datos de concentración de los metabolitos secundarios de la base de datos. Elaborado por Ayala, E. (2021).

Se analizó los datos de flavonoides, antocianinas y carotenoides y se evidenció los metabolitos más representativos de cada grupo. Se pudo determinar que los metabolitos con mayor número de datos documentados en el grupo de los flavonoides fueron la quercetina y el kaempferol con 523 y 428 datos respectivamente. En el grupo de las antocianinas fueron la cianidina y pelargonidina con 142 y 97 datos respectivamente. En el grupo de los carotenoides fueron β -caroteno y violaxantina con 15 y 14 datos documentados (Tabla 1).

Tabla 1

Número de Datos Documentados sobre Flavonoides, Antocianinas y Carotenoides, en Rosas a partir de la Base de Datos

Flavonoides		Antocianinas		Carotenoides	
Metabolitos	N° de datos	Metabolitos	N° de datos	Metabolitos	N° de datos
				β -caroteno	15
				Violaxantina	14
Quercetina	523	Cianidina	142	α -caroteno	8
Kaempferol	439	Pelargonidina	97	Anteraxantina	4
Miricetina	18	Peonidina	25	Luteína	4
Catequina	15	Cianina	23	Luteoxantina	2
Eriodictiol	12	Delfinidina	12	Neoxantina	2
Apigenina	7	Peonina	8	Zeaxantina	2
		Pelargonina	8	Criptoxantina	2
				Xantófila	2
				Aloxantina	2

Nota: Los datos se encuentran organizados de mayor a menor a partir de 1 500 datos documentados sobre metabolitos relacionados a la pigmentación. No se consideraron los sitios de glicosilación o metilación en las estructuras químicas. Las cifras en negrita corresponden a los metabolitos más representativos de cada grupo. Elaborado por Ayala, E. (2021).

A partir de los metabolitos más representativos de cada grupo, se elaboró una nueva base de datos depurada. La nueva base de datos se clasificó según los colores representativos del género *Rosa* determinados en el análisis de la figura 8. En los datos de concentraciones de metabolitos se consideraron solamente las concentraciones de kaempferol, quercetina, pelargonidina, cianidina, β -caroteno y violaxantina (Anexo 2).

Determinación de la Línea Base

Para la determinación de la línea base, se elaboraron tablas por cada uno de los metabolitos representativos en relación a la concentración de cada color, partiendo de la base de datos depurada. Los datos de las concentraciones de los metabolitos se agruparon con el objetivo de disminuir la dispersión entre ellos. Las tablas pueden evidenciarse en el Anexo 3. A partir de los datos de estas tablas se calcularon las medias y las desviaciones estándar. Los resultados de este análisis se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2

Medias y Desviaciones Estándar de la Concentración de los Metabolitos Representativos por cada Color de la Base de Datos Depurada

	Flavonoides		Antocianinas		Carotenoides	
	Kaempferol	Quercetina	Pelargonidina	Cianidina	β -caroteno	Violaxantina
Blanco	6,3847 \pm 1,29	7,1807 \pm 1,07	0,0486 \pm 1,70	0,0299 \pm 0,87	0,0002 \pm 0,22	0,0057 \pm 0,01
Rojo	0,2663 \pm 0,30	8,0272 \pm 0,35	0,4158 \pm 0,79	1,8429 \pm 0,16	0,0002 \pm 0,28	-
Rosado	7,8328 \pm 0,05	8,2355 \pm 0,78	0,0552 \pm 0,87	0,4214 \pm 0,48	0,0001 \pm 0,05	0,0016 \pm 0,01
Morado	0,5040 \pm 1,12	1,5916 \pm 0,80	0,0060 \pm 0,65	0,6472 \pm 1,01	-	-
Amarillo	0,7234 \pm 0,30	0,0062 \pm 0,22	-	0,0140 \pm 0,01	0,0045 \pm 0,53	0,0382 \pm 0,60
Naranja	0,8287 \pm 0,75	0,1832 \pm 0,55	0,2539 \pm 0,87	0,1282 \pm 0,75	-	0,0081 \pm 0,01

Nota: Los datos [mg/mL] corresponden a la media \pm desviación estándar calculados a partir de la base de datos depurada. (-) representa ausencia de datos. Elaborado por Ayala, E. (2021).

A partir de los datos de la Tabla 2 se realizó la comparación de concentración de metabolito por color, mediante un análisis de varianzas (ANOVA) y la prueba de Tukey. En ambas pruebas estadísticas se consideró el 95% de confianza ($p < 0,05$). Los resultados de los análisis estadísticos se presentan en el Anexo 4, sin embargo, los resultados de las pruebas de Tukey se resumen en la Tabla 3 con ($p < 0,05$).

Tabla 3*Resultados Resumidos de las Pruebas de Tukey*

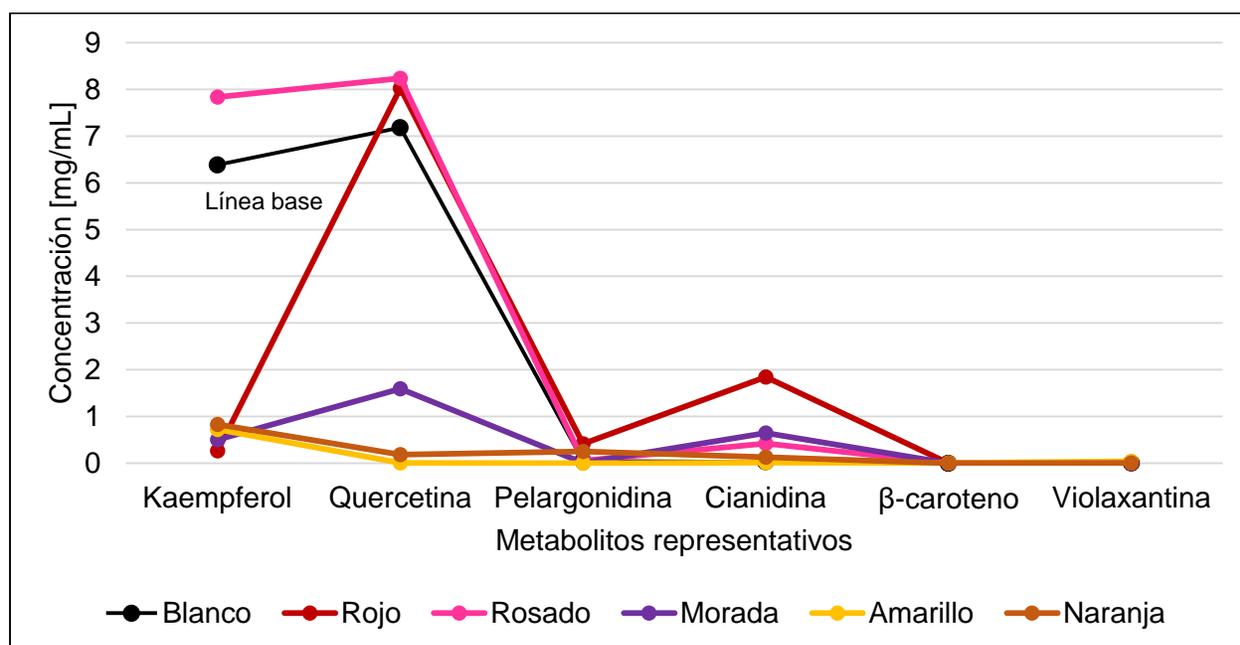
Metabolito	Combinaciones	p-valor de la prueba de Tukey
Kaempferol	Rosado-Amarillo	0,01193
	Rojo-Blanco	0,04075
	Rosado-Morado	0,00896
	Rosado-Naranja	0,01366
	Rosado-Rojo	0,00654
Quercetina	Rojo-Amarillo	0,03036
	Rosado-Amarillo	0,02480
	Rojo-Naranja	0,03600
	Rosado-Naranja	0,02946
Pelargonidina	Rojo-Blanco	0,01418
	Rojo-Morado	0,00534
	Rosado-Rojo	0,01646
Cianidina	Morado-Amarillo	0,01365
	Rojo-Amarillo	0,00000
	Morado-Blanco	0,01708
	Rojo-Blanco	0,00000
	Rojo-Morado	0,00000
	Rojo-Naranja	0,00000
	Rosado-Rojo	0,00000
β-caroteno	Blanco-Amarillo	0,00002
	Rojo-Amarillo	0,00002
	Rosado-Amarillo	0,00001
Violaxantina	Blanco-Amarillo	0,00041
	Naranja-Amarillo	0,00095
	Rosado-Amarillo	0,00001

Nota: Se tomó en cuenta solamente p-valor < 0,05. Elaborado por: Ayala, E. (2021).

A partir de estos resultados, se realizó un análisis inferencial donde se pudo determinar que el blanco es el color que presenta la menor diferencia significativa. Por lo tanto, se define al color blanco como la línea base del estudio. En la figura 10, se observa la relación de las medias de las concentraciones de los metabolitos representativos por color en comparación a la línea base (color blanco).

Figura 10

Concentraciones de los Metabolitos en Relación al Color según la Línea Base



Nota: La concentración de los metabolitos se presenta en [mg/mL]. La línea base está representada por el color negro. Elaborado por Ayala, E. (2021).

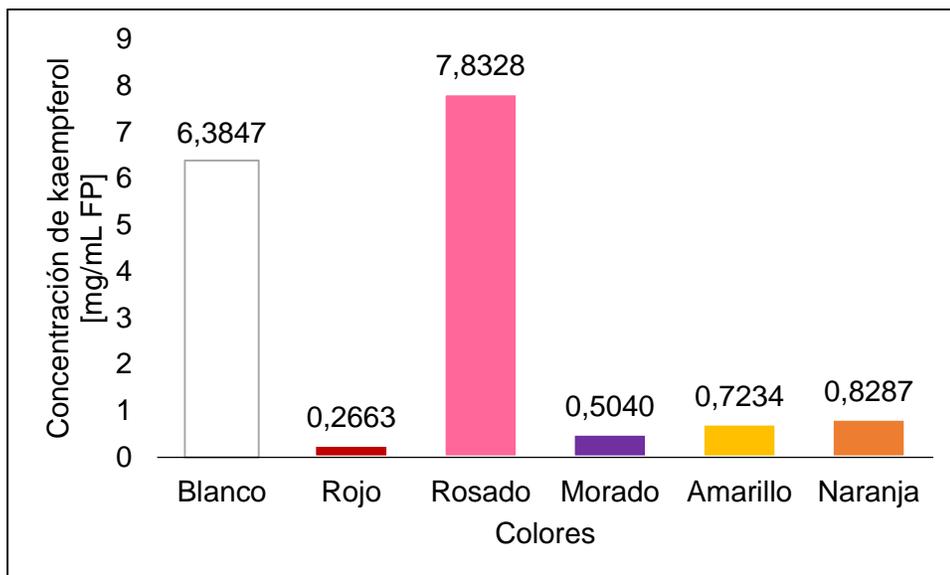
Análisis de las Rutas Biosintéticas

Para el análisis de las rutas biosintéticas, se compararon las medias de los metabolitos de la Tabla 2. En la figura 11 se evidencia mediante gráfica de barras la comparación de las medias de las concentraciones de kaempferol según los colores representativos del género *Rosa*. Los colores que presentaron mayor concentración de kaempferol son el color rosado con

7,8328 mg/mL y el color blanco con 6,3847 mg/mL. Por otro lado, el color morado presentó 0,5040 mg/mL y el color rojo 0,2663 mg/mL, siendo las menores concentraciones de kaempferol.

Figura 11

Medias de Concentración de Kaempferol en relación a los Colores Representativos

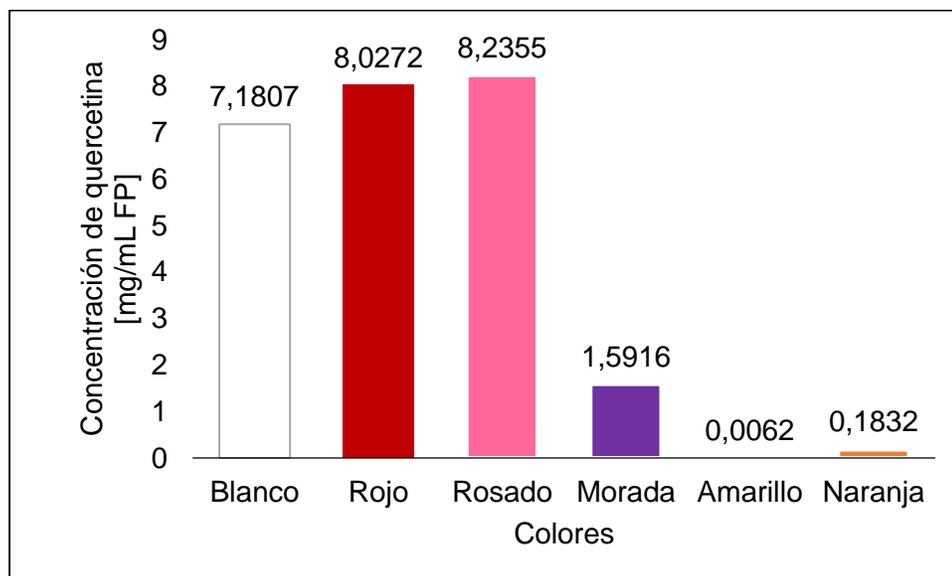


Nota: La concentración de kaempferol se presenta en [mg/mL]. La barra blanca representa la línea base. Elaborado por Ayala, E. (2021).

En la figura 12 se puede observar la comparación de las medias de las concentraciones de quercetina según los colores representativos del género *Rosa*. Los colores que presentaron mayor concentración de quercetina son el color rosado con 8,2355 mg/mL, el color rojo con 8,0272 mg/mL y el color blanco con 7,1807 mg/mL. El color naranja presentó 0,1832 mg/mL y el color amarillo 0,0062 mg/mL, siendo los colores que poseen menor concentración de quercetina.

Figura 12

Medias de Concentración de Quercetina en relación a los Colores Representativos

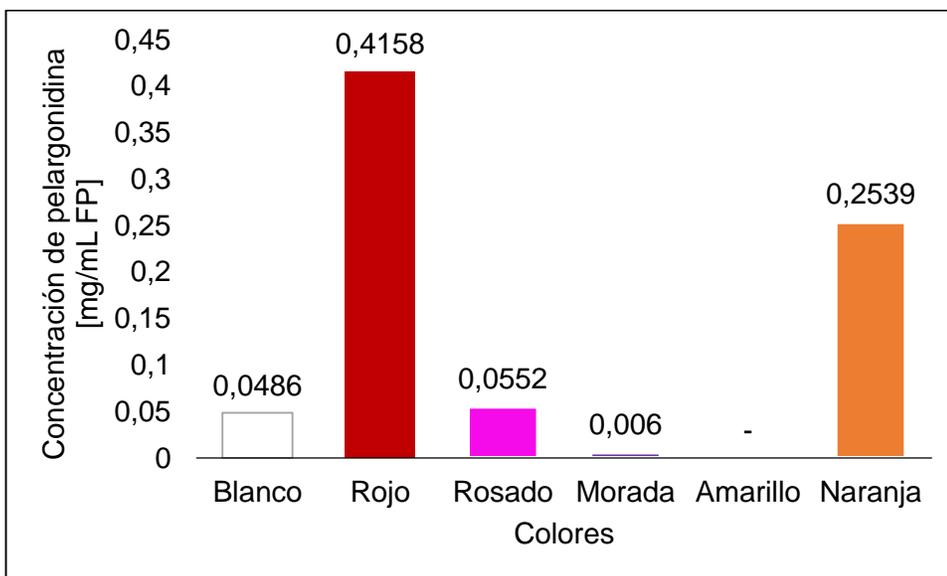


Nota: La concentración de quercetina se presenta en [mg/mL]. La barra blanca representa la línea base. Elaborado por Ayala, E. (2021).

En la figura 13 se evidencia la comparación de las medias de las concentraciones de pelargonidina según los colores representativos del género *Rosa*. Los colores que contienen mayor concentración de pelargonidina son el color rojo con 0,4158 mg/mL y el color naranja con 0,2539 mg/mL. El color que contiene menor concentración de pelargonidina es el color morado con 0,0060 mg/mL. Por otro lado, el color amarillo no presenta concentración de pelargonidina por ausencia de datos.

Figura 13

Medias de Concentración de Pelargonidina en relación a los Colores Representativos

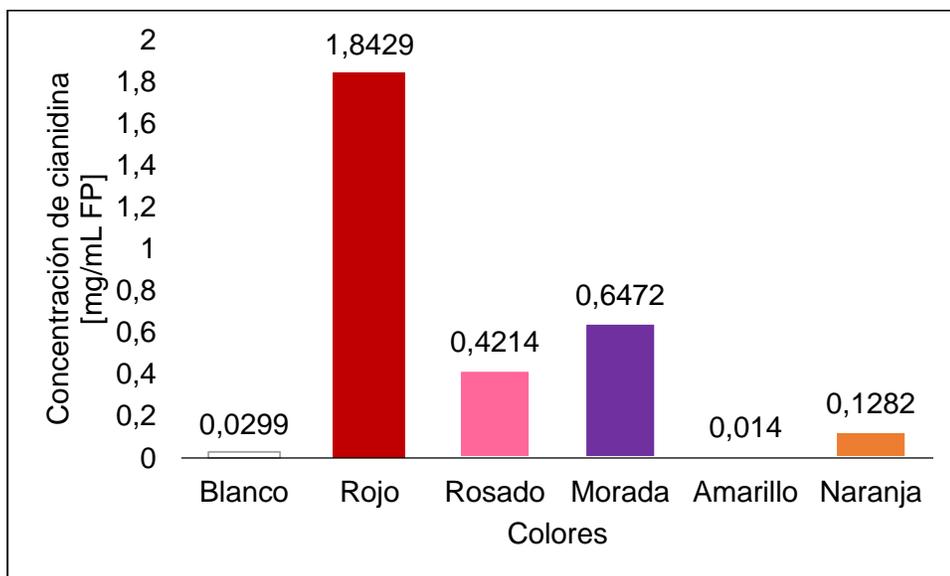


Nota: La concentración de pelargonidina se presenta en [mg/mL]. La barra blanca representa la línea base. (-) representa ausencia de datos de concentración de pelargonidina. Elaborado por Ayala, E. (2021).

La comparación de las medias de las concentraciones de cianidina según los colores representativos del género *Rosa* se puede observar en la figura 14. El color con mayor concentración de cianidina es el color rojo con 1,8429 mg/mL. Los colores con menor concentración de cianidina es el color blanco con 0,0299 mg/mL y el color amarillo con 0,014 mg/mL.

Figura 14

Medias de Concentración de Cianidina en relación a los Colores Representativos

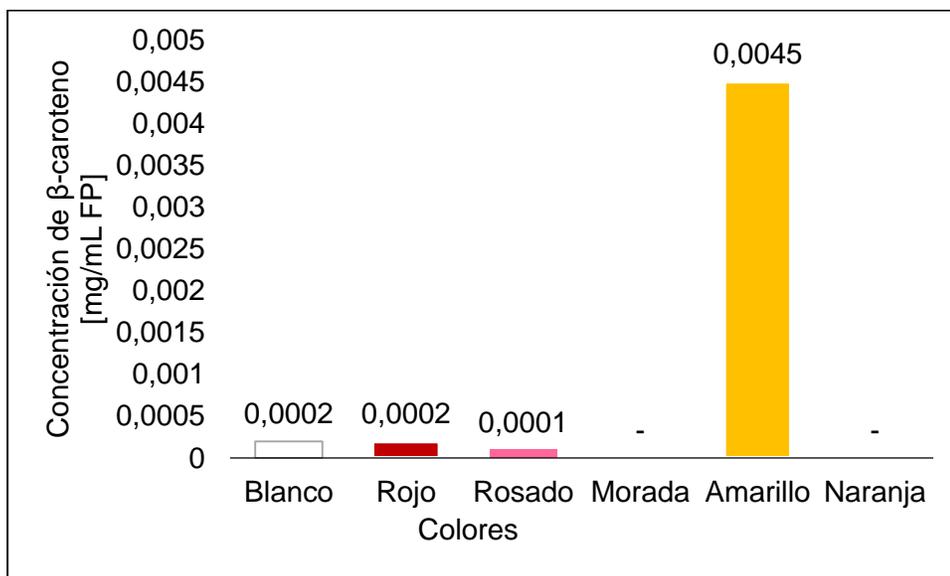


Nota: La concentración de cianidina se presenta en [mg/mL]. La barra blanca representa la línea base. Elaborado por Ayala, E. (2021).

Se observa en la figura 15 la comparación de las medias de las concentraciones de β -caroteno según los colores representativos del género *Rosa*. El color que presenta mayor concentración de β -caroteno, es el color amarillo con 0,0045 mg/mL. Los colores que presentan menor concentración de β -caroteno son el color rojo y el color blanco con 0,0002 mg/mL respectivamente y el color rosado con 0,0001 mg/mL. Por otro lado, el color naranja y el color morado no presentan concentración de β -caroteno por ausencia de datos.

Figura 15

Medias de Concentración de β -caroteno en relación a los Colores Representativos

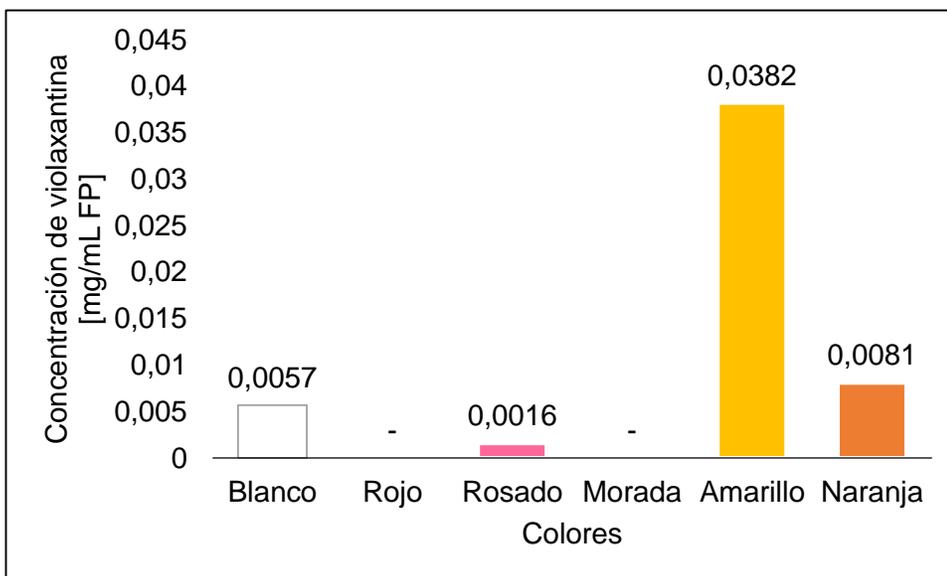


Nota: La concentración de β -caroteno se presenta en [mg/mL]. La barra blanca representa la línea base. (-) representa ausencia de datos de concentración de β -caroteno. Elaborado por Ayala, E. (2021).

En la figura 16 se puede observar la comparación de las medias de las concentraciones de violaxantina según los colores representativos del género *Rosa*. El color que presenta mayor concentración de violaxantina es el color amarillo con 0,0382 mg/mL. El color con menor concentración de violaxantina es el color rosado con 0,0016 mg/mL. Por otro lado, el color rojo y el color morado no poseen concentración por ausencia de datos.

Figura 16

Medias de Concentración de Violaxantina en relación a los Colores Representativos

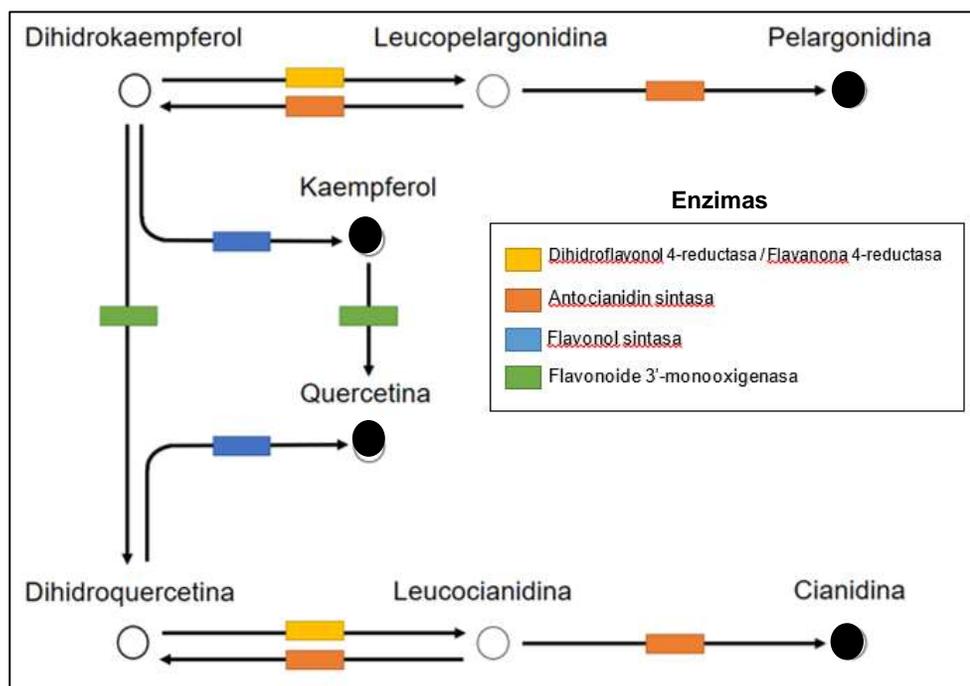


Nota: La concentración de violaxantina se presenta en [mg/mL]. La barra blanca representa la línea base. (-) representa ausencia de datos de concentración de violaxantina. Elaborado por Ayala, E. (2021).

En base a las medias de las concentraciones de los metabolitos por color, se analizó las rutas biosintéticas de flavonoides, antocianinas y carotenoides. En este análisis se determinó la síntesis a partir del último precursor de cada metabolito representativo. En la figura 17 se observa la ruta biosintética de los flavonoides y antocianinas a partir del precursor dihidrokaempferol. En el grupo de los flavonoides el dihidrokaempferol es el precursor del kaempferol y de la quercetina. En el grupo de las antocianinas el dihidrokaempferol es el precursor de la pelargonidina y la cianidina.

Figura 17

Ruta Biosintética de Flavonoides y Antocianinas a partir del Dihidrokaempferol

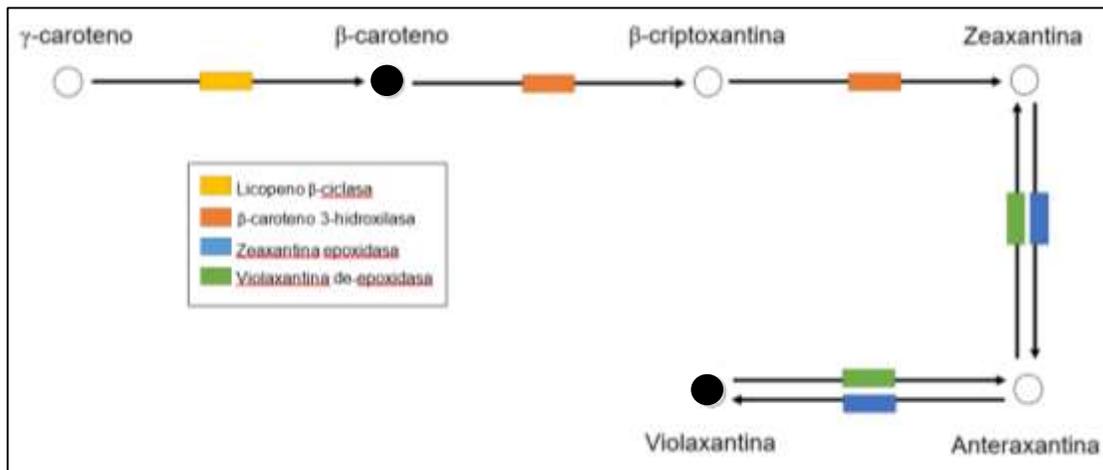


Nota: La gráfica indica la síntesis de los metabolitos representativos: kaempferol, quercetina, pelargonidina y cianidina, marcados de color negro, a partir de los precursores representados de color blanco. Elaborado por Ayala, E. (2021).

En la figura 18 se evidencia la ruta biosintética de los carotenoides a partir del precursor γ -caroteno. En el grupo de los carotenoides el γ -caroteno es precursor del β -caroteno. El β -caroteno a más de ser un metabolito representativo de la pigmentación de pétalos del género *Rosa*, es a su vez precursor de la violaxantina.

Figura 18

Ruta Biosintética de Carotenoides a partir del γ -caroteno



Nota: La gráfica indica la síntesis de los metabolitos representativos: β -caroteno y violaxantina, marcados de color negro, a partir de los precursores representados de color blanco. Elaborado por Ayala, E. (2021).

Adicionalmente, se realizó un análisis inferencial de estas rutas biosintéticas en comparación a las medias de las concentraciones de los metabolitos. El resultado de este análisis implicó la selección de las principales enzimas de cada ruta biosintética, las cuales son necesarias para la síntesis de estos metabolitos. Los resultados del análisis se evidencian en la Tabla 4.

Tabla 4*Enzimas Principales de las Rutas Biosintéticas en la Síntesis de los Metabolitos**Representativos*

Ruta biosintética de flavonoides y antocianinas			Ruta biosintética de carotenoides		
Enzimas	Precursor	Síntesis	Enzimas	Precursor	Síntesis
Dihidroflavonol 4-reductasa (DFR)	Dihidrokaempferol Dihidroquercetina	Pelargonidina Cianidina	Licopeno β -ciclase (CHYB)	γ -caroteno	β -caroteno
Flavonol sintasa (FLS)	Dihidrokaempferol Dihidroquercetina	Kaempferol Quercetina	Zeaxantina epoxidasa (ZEP)	Anteraxantina	Violaxantina
Flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H)	Dihidrokaempferol Kaempferol	Dihidroquercetina Quercetina			

Nota: Las abreviaturas corresponden a los acrónimos correspondientes a cada enzima.

Elaborado por: Ayala, E. (2021).

A partir de estos resultados y la selección de las enzimas principales de las rutas biosintéticas, se determinó la acción requerida de incrementar o disminuir la concentración de las enzimas para la obtención de cada color en función de la línea base. En la Tabla 5 se evidencia el análisis sobre la actividad de las enzimas en cada ruta metabólica según el color.

Tabla 5

Acción en las Enzimas Principales de las Rutas Metabólicas por Color Representativo del Género Rosa

Color	Ruta biosintética de flavonoides y antocianinas		Ruta biosintética de carotenoides	
	Enzima	Acción	Enzima	Acción
Rojo	Dihidroflavonol 4-reductasa	Incrementar		
	Flavonol sintasa	Disminuir		
Rosado	Dihidroflavonol 4-reductasa	Incrementar		
Morado	Dihidroflavonol 4-reductasa	Incrementar		
	Flavonol sintasa	Disminuir		
	Flavonoide 3'-hidroxilasa	Disminuir		
Amarillo	Flavonol sintasa	Disminuir	Licopeno beta-ciclasa	Incrementar
	Flavonoide 3'-hidroxilasa	Disminuir	Zeaxantina epoxidasa	Incrementar
Naranja	Dihidroflavonol 4-reductasa	Incrementar		
	Flavonol sintasa	Disminuir	Zeaxantina epoxidasa	Incrementar

Nota: El color blanco no está presente por representar la línea base. Elaborado por: Ayala, E. (20201).

Determinación de los Factores de Transcripción

Para la determinación de los factores de transcripción relacionados a la regulación de expresión de enzimas, se realizó la búsqueda de la secuencia génica de cada enzima en el portal web del NCBI. Se consideró a *R. chinensis* como la especie de referencia del género *Rosa*, por ser la especie con mayor información en esta base. A partir de la búsqueda realizada se obtuvo el código de la secuencia de referencia del mRNA, el gen ID, y la posición del codón de inicio de la transcripción (Tabla 6).

Tabla 6*Datos de las Secuencias Génicas de las Enzimas Principales*

Enzima principal	Secuencia de referencia del mRNA	Gen ID	Posición del codón de inicio
Dihidroflavonol 4-reductasa	XM_024311351.1	112173668	109
Flavonol sintasa	XM_024307725.1	112170431	186
Flavonoide 3'-hidroxilasa	XM_024316694.1	112178545	34
Licopeno β -ciclase	XM_024328910.1	112189564	263
Zeaxantina epoxidasa	XM_024326398.1	112187551	1

Nota: Los códigos de la secuencia de referencia del mRNA y del gen ID pertenece a la base de datos del NCBI. Elaborado por: Ayala, E. (2021).

Las secuencias génicas fueron descargadas en formato FASTA, considerando cerca de 10 000 nucleótidos anteriores al extremo 5'. Las secuencias descargadas fueron analizadas en el software PlantPAN 3.0 para la identificación de las islas CpNpGs. A partir de este análisis se identificó la posición de inicio y de terminación de las islas CpNpGs, como se evidencia en la tabla 7.

Tabla 7*Identificación de las Islas CpNpGs de la Región Promotora*

Gen	Posición de las islas CpNpGs (bp)
Dihidroflavonol 4-reductasa	-1150: -647
Flavonol sintasa	-3356: -2483
Flavonoide 3'-hidroxilasa	-5707: -5113
Licopeno β -ciclase	-6655: -5670
Zeaxantina epoxidasa	-2413: -1643

Nota: Las cifras corresponden a la posición de inicio y terminación de las islas CpNpGs a partir del punto de inicio de la transcripción. Elaborado por: Ayala, E. (2021).

La identificación de la posición de inicio de las islas CpNpGs, permitió seleccionar 1 000 nucleótidos como la región promotora en cada gen (Anexo 5). Las regiones promotoras seleccionadas se insertaron en formato FASTA en el software PlantPan 3.0, para el análisis del promotor a partir de la base de datos de *Arabidopsis thaliana*. A partir de estos resultados se identificaron distintas secuencias de sitios de unión de los factores de transcripción, secuencias denominadas motifs. Estos factores, activador y represor, se seleccionaron a partir de estas secuencias. Se consideró valores cercanos a 1 en "Similar Score" como parámetro de selección (Tabla 8).

Tabla 8*Factores de Transcripción Seleccionadas a partir de la Secuencia Motif*

	Enzimas	Secuencias motifs	Factor de transcripción	Similar score
TF Activador	Dihidroflavonol 4-reductasa	TF_motif_seq_0239	AT1G29160	1
	Flavonol sintasa	TF_motif_seq_0239	AT1G29160	1
	Flavonoide 3'-hidroxilasa	TF_motif_seq_0239	AT1G29160	1
	Licopeno β -ciclase	TFmatrixID_1052	AT2G06200	1
	Zeaxantina epoxidasa	TF_motif_seq_0239	AT1G29160	1
TF Represor	Dihidroflavonol 4-reductasa	TF_motif_seq_0237	AT1G51600	1
	Flavonol sintasa	TF_motif_seq_0257	AT1G09030	1
	Flavonoide 3'-hidroxilasa	TF_motif_seq_0237	AT1G51600	1
	Licopeno β -ciclase	TF_motif_seq_0257	AT1G09030	1
	Zeaxantina epoxidasa	TF_motif_seq_0237	AT1G51600	1

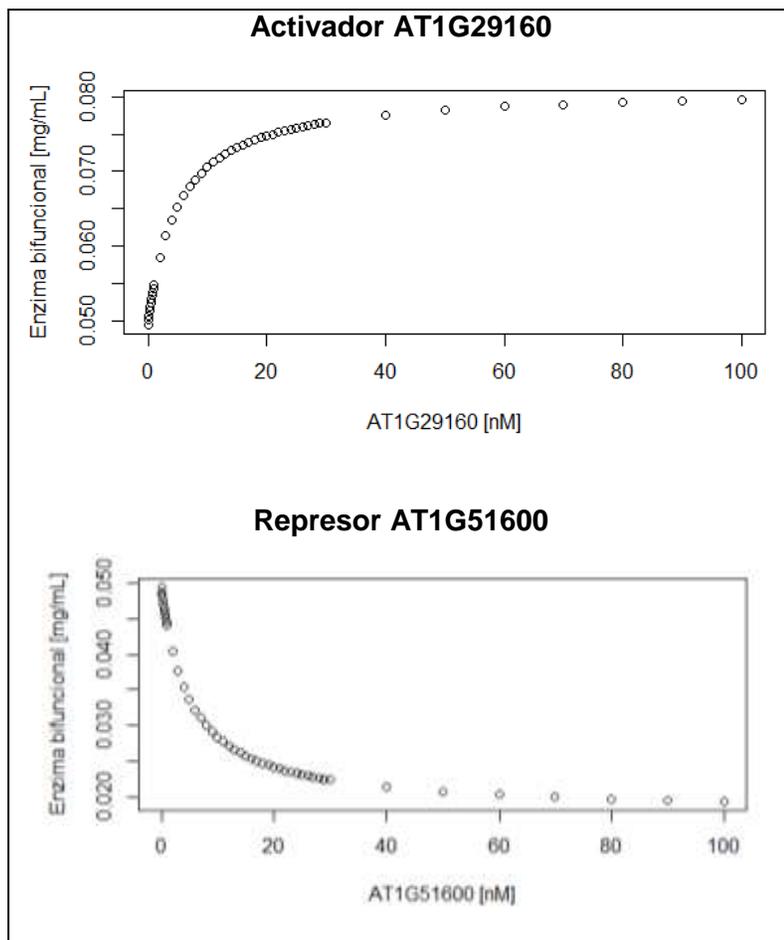
Nota: TF corresponde a factor de transcripción, motif es la secuencia del sitio de unión del factor de transcripción y Similar Score representa la similitud entre la secuencia analizada y las secuencias de la base de datos. Elaborado por: Ayala, E. (2021).

Modelamiento Matemático

El modelamiento matemático fue generado en el programa R bajo los lineamientos descritos en la metodología. El modelo representa la síntesis proteica a partir de la concentración de un inductor, ya sea activador (tendencia creciente) o represor (tendencia decreciente), para obtener la concentración de la enzima necesaria para la determinación de cada color. Se realizó una gráfica por cada factor de transcripción. La figura 19 corresponde al modelo matemático de los factores de transcripción, activador y represor, de la enzima dihidroflavonol 4-reductasa. En esta figura se observa, que la enzima posee una concentración máxima cercana a 0,08 mg/mL a partir de los 60 nM del activador AT1G29610. La concentración mínima alcanza el 0,02 mg/mL a partir de los 60 nM del represor AT1G51600.

Figura 19

Modelo Matemático de los TF para Dihidroflavonol 4-reductasa



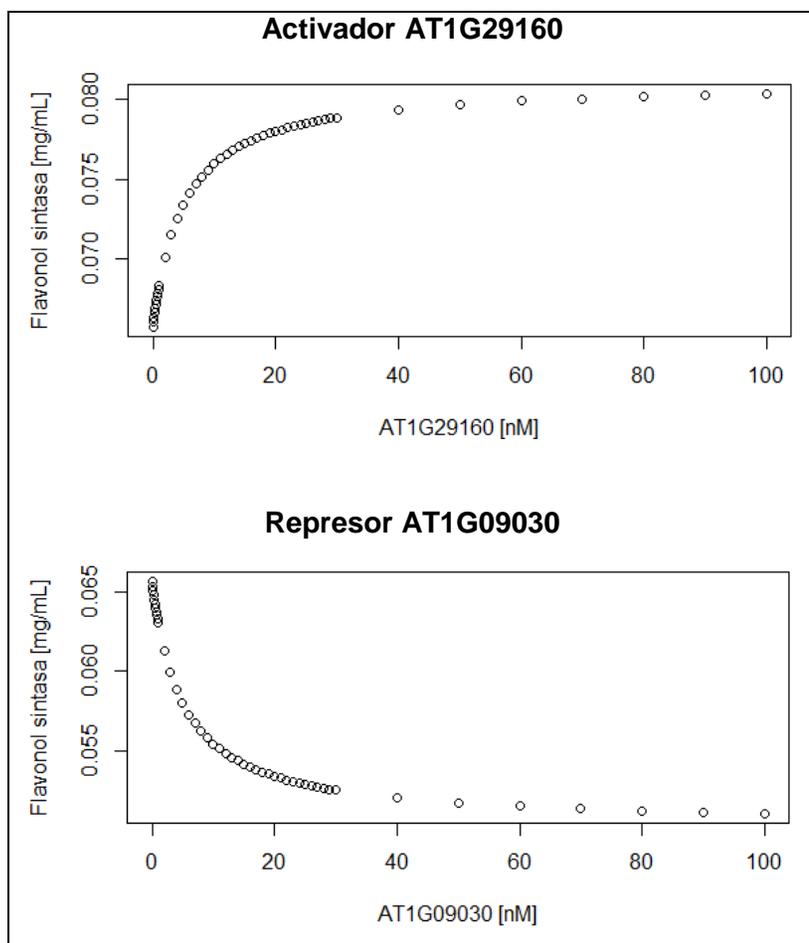
Nota: Las constantes y los coeficientes utilizados para el modelamiento matemático, se consideraron valores en condiciones normales de *Arabidopsis thaliana*. El eje X representa la concentración del factor de transcripción [nM]. El eje Y representa la concentración de enzima [mg/mL]. Elaborado por: Ayala, E. (2021).

Las gráficas de la figura 20 presentan el modelo matemático de los factores de transcripción, activador y represor de la enzima flavonol sintasa. Según el modelo matemático, se estima una concentración máxima cercana a 0,085 mg/mL de enzima a partir de los 60 nM del

activador AT1G29610. La concentración mínima de enzima alcanza el 0,05 mg/mL a partir de los 60 nM del represor AT1G09030.

Figura 20

Modelo Matemático de los TF para Flavonol Sintasa

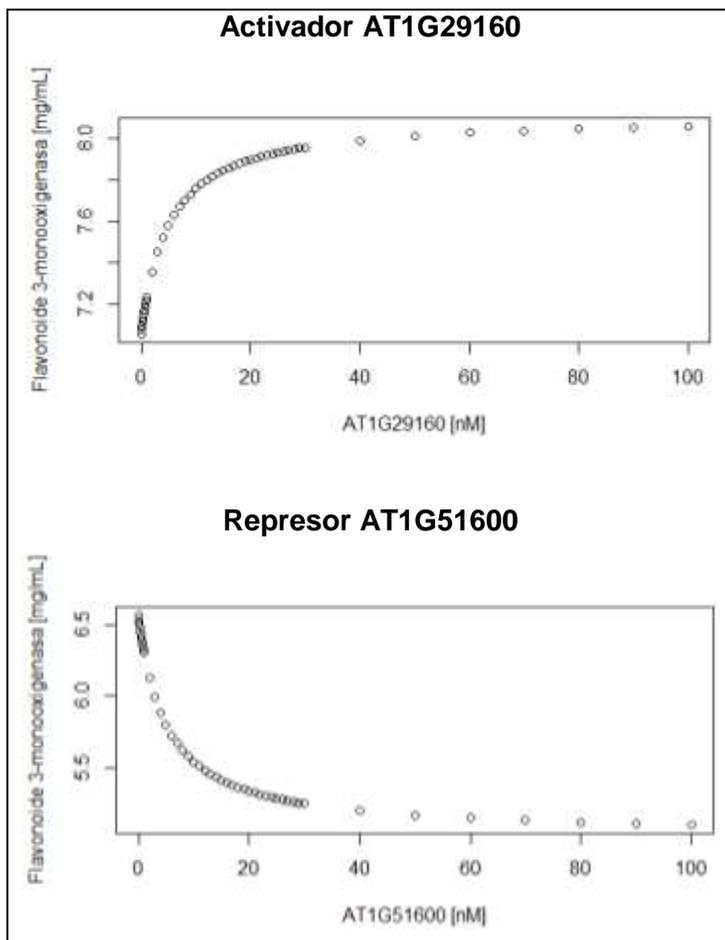


Nota: Las constantes y los coeficientes utilizados para el modelamiento matemático, se consideraron valores en condiciones normales de *Arabidopsis thaliana*. El eje X representa la concentración del factor de transcripción [nM]. El eje Y representa la concentración de enzima [mg/mL]. Elaborado por: Ayala, E. (2021).

La figura 21 corresponde a las gráficas del modelo matemático de los factores de transcripción, activador y represor de la enzima flavonoide 3'-hidroxilasa. Según el modelamiento, la enzima posee una concentración máxima aproximadamente de 8 mg/mL a partir de los 60 nM del activador AT1G29610. La concentración mínima alcanza 5 mg/mL a partir de los 60 nM del represor AT1G51600.

Figura 21

Modelo matemático de los TF para Flavonoide 3'-hidroxilasa

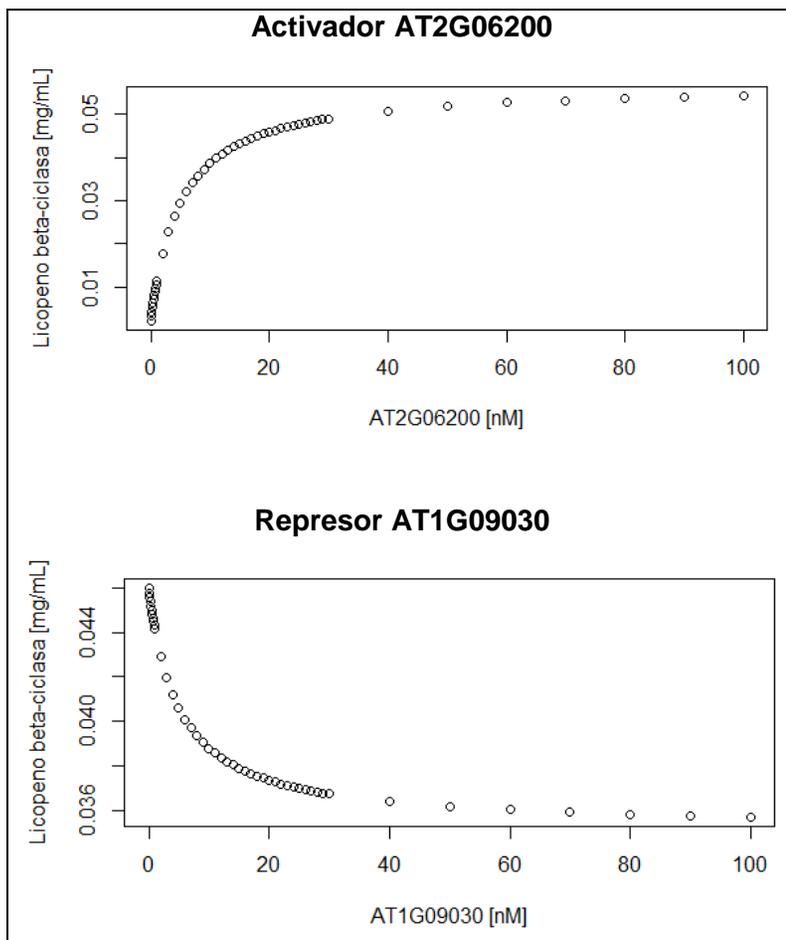


Nota: Las constantes y los coeficientes utilizados para el modelamiento matemático, se consideraron valores en condiciones normales de *Arabidopsis thaliana*. El eje X representa la concentración del factor de transcripción [nM]. El eje Y representa la concentración de enzima [mg/mL]. Elaborado por: Ayala, E. (2021).

En la figura 22, se indican las gráficas del modelo matemático de los factores de transcripción, activador y represor de la enzima licopeno β -ciclasa. A partir del modelo matemático y las gráficas, se calcula una concentración máxima cercana a 0,085 mg/mL a partir de los 60 nM del activador AT2G06200. La concentración mínima de enzima, alcanza el 0,05 mg/mL a partir de los 60 nM del represor AT1G09030.

Figura 22

Modelo matemático de los TF para Licopeno β -Ciclasa

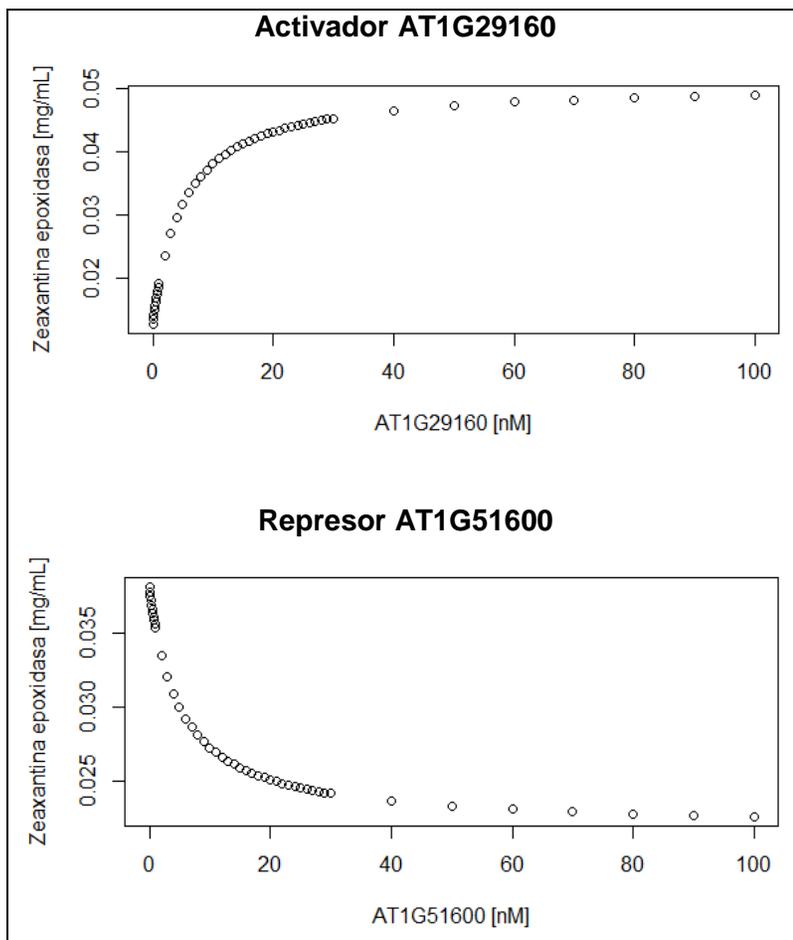


Nota: Las constantes y los coeficientes utilizados para el modelamiento matemático, se consideraron valores en condiciones normales de *Arabidopsis thaliana*. El eje X representa la concentración del factor de transcripción [nM]. El eje Y representa la concentración de enzima [mg/mL]. Elaborado por: Ayala, E. (2021).

La figura 23 corresponde a las gráficas del modelo matemático de los factores de transcripción, activador y represor de la enzima zeaxantina epoxidasa. La enzima posee una concentración máxima cercana a 0,05 mg/mL a partir de los 60 nM del activador AT1G29610. La concentración mínima alcanza el 0,02 mg/mL a partir de los 60 nM del represor AT1G51600.

Figura 23

Modelo matemático de los TF para Zeaxantina Epoxidasa



Nota: Las constantes y los coeficientes utilizados para el modelamiento matemático, se consideraron valores en condiciones normales de *Arabidopsis thaliana*. El eje X representa la concentración del factor de transcripción [nM]. El eje Y representa la concentración de enzima [mg/mL]. Elaborado por: Ayala, E. (2021).

Capítulo 4: Discusión

El presente proyecto de investigación tiene como objeto analizar la actividad de los reguladores transcripcionales de los genes relacionados a la pigmentación de pétalos del género *Rosa*, mediante un modelamiento matemático. Este proyecto pretende relacionar la información bibliográfica sobre datos cuantitativos y cualitativos con la especie de rosa, variedad, coloración en pétalos y la concentración de los metabolitos secundarios encargados de la pigmentación de los botones florales.

Las bases de datos son fundamentales para realizar análisis estadísticos, análisis predictivos y modelamientos matemáticos. Las publicaciones en un tema específico pueden ser reducidas, pero depende de los datos que se pueda obtener para conseguir un buen análisis. La presente investigación recolectó cerca de 1 500 datos de concentración de metabolitos relacionados con la pigmentación de pétalos de rosas.

Los principales pigmentos y colores en el mercado de rosas son rojo, blanco, rosado y morado, pero existen variedades de otros colores, bicolors o tinturadas (Wan, *et al.*, 2019). El análisis realizado a partir de la base de datos del presente proyecto sobre coloración, muestra el porcentaje de colores que sobresalen en el estudio. El rosado con 51,64%, el blanco con 18,85%, el rojo con 13,11%, el naranja con 6,56%, el amarillo con 4,92% y el morado con 4,92%. Los colores en las flores son importantes por el atractivo visual, lo que permite seleccionarlos y cultivarlos por su importancia económica. Esto es confirmado por algunos estudios como el de Waliczek, Byrne & Holeman (2018), donde se determina que las rosas de color rojo, rosado, blanco y morado, son las más cotizadas independientemente de la temporada por consumidores de flores de exportación.

Principales pigmentos y rutas metabólicas

Los principales grupos de pigmentos en pétalos de flores son los flavonoides, antocianinas, carotenoides y betalainas, sin embargo, las betalainas no están presentes en rosas (Noman, *et al.*, 2017). Esto se confirma con los resultados obtenidos en la presente investigación donde se observó que 1098 datos pertenecen a flavonoides (74,59%), 208 a antocianinas (20,24%) y 76 a carotenoides (5,17%), como los principales pigmentos relacionados a la coloración de pétalos en rosas.

Los flavonoides son un amplio grupo de fenilpropanoides con estructura C₆-C₃-C₆. Los flavonoides se clasifican en chalconas, flavonas, flavonoles y antocianinas. En la Tabla 1 sobre el número de datos documentados de flavonoides, se obtuvo mayor cantidad de datos en quercetina con 523 y kaempferol con 439. Esto se debe a que sus estructuras atraen con mayor facilidad a diferentes grupos hidroxilo, metilo, glicosilo y acilo, que da como resultado varias estructuras que a su vez brindan a los pétalos diversas tonalidades. Esto concuerda con Wan y colaboradores (2019), donde mencionan que las agliconas de flavonoles predominantes en pétalos de rosa son kaempferol y quercetina.

Los kaempferol 3-glicósidos son los responsables de los colores blancos y las tonalidades cremas en los pétalos de flores (Iwashina, *et al.*, 2010). En la comparación de las medias de concentración de kaempferol (Fig. 11), se obtuvo que el color blanco presentó una concentración de 6,3847 mg/mL y el color rosado tuvo una mayor concentración con 7,8328 mg/mL. Los resultados obtenidos concuerdan con el estudio realizado por Ono & Iwashina (2014), donde determinaron concentraciones de kaempferol 3-glicósido, de $6,75 \pm 0.24$ mg/mL para pétalos de color blanco y 6.60 ± 0.13 mg/mL para pétalos de color crema. Los resultados *in silico* en relación a los estudios experimentales muestran una tendencia similar, lo que valida este tipo de análisis.

La quercetina es responsable del color amarillo pálido en rosas como pigmento, sin embargo, la principal función de la quercetina corresponde a la absorción de rayos UV (Anand, Arulmoli, & Parasuraman, 2016). En la figura 12, se obtuvo la mayor concentración de quercetina en el color rosado con 8,2355 mg/mL, seguido del rojo con 8,0272 mg/mL y el blanco con 7,1807 mg/mL. Los resultados indican que solamente el color blanco concuerda con lo planteado por Anand, Arulmoi, & Parasuraman (2016), donde afirmaron que la quercetina provee el color amarillo pálido en pétalos de flores. Sin embargo, Shah, Priya, & Gayathri (2016), afirman que la quercetina es un gran co-pigmento de las antocianinas, las cuales son responsables del color rojo intenso y las distintas tonalidades en rosas, por lo que esta información explica las altas concentraciones obtenidas de quercetina en el color rojo y el color rosado.

Las antocianinas son compuestos pertenecientes al grupo de los flavonoides y son los pigmentos responsables de las variantes del color rojo y rosado en los pétalos de rosas. En la Tabla 1 se pudo observar diferentes tipos de antocianinas, la mayor cantidad de datos se obtuvo para la cianidina con 142, seguido de la pelargonidina con 97 y finalmente la peonidina con 25. Estos resultados concuerdan con Wan y colaboradores (2019) que mencionan que las tres antocianidinas principales en rosas son la pelargonidina, la cianidina y la peonidina. Sin embargo, la presente investigación consideró solamente los dos principales metabolitos de cada grupo, por lo tanto, el estudio se centró en los datos de pelargonidina y cianidina.

La pelargonidina es un pigmento natural perteneciente a las antocianidinas que brinda las tonalidades del rojo al naranja en pétalos de flores. En la comparación de las medias de las concentraciones de pelargonidina, realizadas en el estudio (Fig. 13), los colores que presentan mayor concentración de pelargonidina son el color rojo con 0,4158 mg/mL y el color naranja con 0,2539 mg/mL. Existen escasos resultados de este metabolito en rosas, pero estudios realizados en pétalos de *Tulipa gesneriana* variedad 'Kingsblood' por Hojjati, Shoor, Tehranifar,

& Abedi (2019) confirman concentraciones cercanas a 1 mg/mL de pelargonidina 3-O-malil-glucósido en el color naranja intenso del tulipán. En las rosas las tonalidades naranjas son más tenues, lo que sugiere una menor concentración de pelargonidina, similar a los resultados obtenidos en el presente trabajo.

La cianidina es un tipo de antocianidina que presenta diversas tonalidades dependiendo del pH, del rojo al azul. Ben-Meir, Zuker, Weiss, & Vainstein (2003), determinaron que la cianidina es roja cuando el pH es inferior a 3, azul a un pH superior a 11 y violeta a un pH neutro. Los pétalos de rosas generalmente poseen un pH cercano a 3 y no varían fácilmente como en otras flores (Bendahmane, Dubois, Raymond, & Bris, 2013). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una mayor concentración de cianidina en el color rojo con 1,8429 mg/mL (Fig. 14), lo que concuerda con lo mencionado por Bendahmane y colaboradores.

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides que proporcionan a las plantas las tonalidades amarillo, naranja y rojo. Según los resultados de la Tabla 1 se obtuvo mayor cantidad de β -caroteno y violaxantina. Tanaka, Sasaki & Ohmiya (2009), estudiaron los pigmentos en pétalos de rosas de color naranja y determinaron que los principales carotenoides son los β -carotenoides como β -criptoxantina, violaxantina y β -caroteno. Por lo que se observa una congruencia entre los resultados obtenidos y la información bibliográfica.

El β -caroteno es un pigmento natural que pertenece a los carotenoides y está relacionado con el color amarillo y el color naranja en flores y frutos. Los resultados obtenidos en este análisis muestran una baja concentración de este metabolito (0,0045 mg/mL), lo que posiblemente se explica con los estudios de Wan y colaboradores (2019), que mencionan que los carotenoides presentan concentraciones bajas en la etapa de florecimiento de las rosas, ya que los carotenoides se concentran mayormente en el desarrollo del fruto.

La violaxantina es otro tipo de carotenoide que presenta distintas tonalidades del amarillo claro y del naranja claro en los pétalos de flores. Al analizar las violaxantinas (Fig. 16),

la mayor concentración se observó en el color amarillo con 0,0382 mg/mL, seguido del naranja con 0,0081 mg/mL. Estas concentraciones concuerdan con Wan y colaboradores (2019), donde se determinó que (9Z)-violaxantina fue el carotenoide más predominante en cultivares amarillos y presentaba un rango entre 0,0093 a 0,2401 mg/mL. En cambio, en cultivares naranjas, se determinó (9Z)-violaxantina con una concentración de 0,0042 a 0,1034 mg/mL y (E)-violaxantina con 0,0027 a 0,0524 mg/mL. Estos resultados indican una misma tendencia lo que reafirma el uso de estos datos en este tipo de análisis.

Al realizar el análisis de la ruta biosintética de los flavonoides y antocianinas para seleccionar las enzimas relacionadas con la síntesis de los pigmentos, se consideró únicamente a las enzimas dihidroflavonol 4-reductasa (DFR), flavonol sintasa (FLS) y flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H), por encontrarse en los puntos convergentes de la síntesis de kaempferol, quercetina, pelargonidina y cianidina. Según Tanaka, Sasaki & Ohmiya (2009), la enzima dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) reduce los dihidroflavonoles, dihidrokaempferol y dihidroquercetina, a las correspondientes 3,4-leucoantocianidinas, pelargonidina y cianidina, los cuales son las antocianinas principales seleccionadas en el estudio. La enzima flavonol sintasa (FLS) cataliza la oxidación de los correspondientes dihidroflavonoles para la síntesis de los flavonoles kaempferol y quercetina, los cuales son los metabolitos representativos del grupo de los flavonoides. La enzima flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H) cataliza la hidroxilación de dihidrokaempferol para formar dihidroquercetina, el cual es un punto clave para diferenciar la síntesis de pelargonidina con la síntesis de cianidina. La selección de las enzimas se realizó en base a la síntesis de cada metabolito, tomando en cuenta el último precursor que define la coloración de los pétalos.

Al analizar la ruta biosintética de los carotenoides, se consideró solamente las enzimas licopeno β -ciclase (LCYB) y zeaxantina epoxidasa (ZEP), por estar implicados en la síntesis de β -caroteno y violaxantina. Según Tanaka, Sasaki & Ohmiya (2009), la enzima licopeno β -

ciclase (LCYB) cataliza la ciclación del licopeno para la síntesis de β -caroteno. La enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP) cataliza la epoxidación en las posiciones C5,6 y C5',6' del anillo b de la zeaxantina para la síntesis de violaxantina. Estas enzimas son importantes por encontrarse en los puntos convergentes de la ruta biosintética para diferenciar la síntesis de β -caroteno y la de violaxantina.

Análisis Transcripcional de Genes

En la regulación transcripcional la región promotora es la encargada de controlar la activación o desactivación de la transcripción de un gen determinado. La regulación de la región promotora depende de proteínas denominadas factores de transcripción. La regulación de los factores de transcripción comprende la activación, represión y el control de la velocidad de transcripción.

A partir de la región promotora se seleccionaron activadores y represores por cada enzima. Los TF activadores seleccionados fueron: AT1G29160 y AT2G06200. El activador AT1G29160 se seleccionó por estar relacionado con la ruta biosintética de los flavonoides y carotenoides. Smith y otros (2019), menciona que este factor codifica una proteína que contiene el dominio de los dedos de zinc de tipo dof. El otro activador AT2G06200, se seleccionó porque está relacionado con las etapas de florecimiento de las rosas. Lantzouni y colaboradores (2020), afirman que AT2G06200 interactúa con factores de crecimiento y regula el crecimiento del botón floral bajo estrés térmico.

Los TF represores seleccionados fueron: AT1G51600 y AT1G09030. El factor de transcripción represor AT1G51600, se seleccionó por estar presente en la floración de las rosas. Esta información concuerda con Smith y otros (2019), donde mencionan que AT1G51600 es un miembro de una nueva familia de factores de transcripción de tipo GATA específicos de plantas y participa activamente en el desarrollo del botón floral. El otro factor represor AT1G09030, se seleccionó porque se relaciona con las rutas metabólicas de

pigmentos en flores. Zhao y otros (2016), afirman que AT1G09030 es un factor de transcripción que interactúa en la síntesis de pigmentos en la etapa S4 y S5 del desarrollo de los botones florales. La selección de estos factores de transcripción, tanto activadores y represores, fue acertada ya que permitieron realizar el modelamiento matemático por presentar un 'similar score' cercano a 1, requerido para el análisis sobre la regulación transcripcional.

Modelamiento Matemático

En la actualidad, los modelos matemáticos son empleados para comprender y analizar las redes reguladoras de genes (GRN). Se pueden utilizar diferentes tipos de modelos matemáticos, como los modelos lógicos, continuos y estocásticos, para describir la regulación génica. Sin embargo, la ecuación de Hill es la función matemática mejor estudiada para comprender la regulación génica.

El análisis de los factores de la regulación transcripcional de los pigmentos principales, se realizó mediante un modelo matemático para cada factor de transcripción y enzima. Los parámetros utilizados para la obtención de las constantes fueron en base a *Arabidopsis thaliana* en condiciones normales. Las constantes se seleccionaron a partir de la base de datos de BioNumbers y artículos científicos. Las condiciones iniciales y las constantes para el modelamiento se deben establecer previamente ya sea de manera experimental o de fuentes bibliográficas científicas (Ehsan & Hasan, 2018).

En los resultados del modelo matemático, se observa una tendencia creciente para los activadores y una tendencia decreciente para los represores, lo que se asemeja a la representación de la ecuación de Michaelis-Menten con tendencia creciente en el caso de una regulación génica positiva o una tendencia decreciente en caso de una regulación negativa (Ehsan & Hasan, 2018).

El modelo matemático basado en la ecuación de Hill, permite calcular la concentración de las enzimas a partir de la concentración de los factores de transcripción, de tal manera que

se pueda regular la transcripción de los genes correspondientes a las enzimas y por ende el color. El aumento o disminución de la concentración de las enzimas, permitirá obtener diferentes colores a partir de la línea base del estudio. Este modelamiento puede relacionarse con el estudio realizado por Katsumoto y otros (2007), quienes incrementaron la actividad de la flavonol 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) en rosas para la obtención del color azul. La modificación de esta enzima, perteneciente a la ruta de los flavonoides y antocianinas, generó nuevas variedades de rosas de color morado que no se encuentran de manera natural. Es por esta razón la importancia de este estudio, que muestra que la regulación de la expresión enzimática de las rutas biosintéticas de los pigmentos de pétalos, tanto en aumento o en disminución, podrá generar nuevos colores en rosas de manera efectiva.

Capítulo 5: Conclusiones

- La metodología empleada en la búsqueda de datos permitió analizar los principales metabolitos involucrados en la ruta biosintética de la rosa con una base de aproximadamente 1 500 datos.
- Se observó que los principales grupos de pigmentos relacionados con la coloración de los pétalos del género *Rosa* son los flavonoides (74,59%), antocianinas (20,24%) y carotenoides (5,16%).
- Se determinó al color blanco, mediante ANOVA y prueba de Tukey, como la línea base de la concentración de metabolitos por presentar menor diferencia significativa.
- Las enzimas seleccionadas a partir del análisis de la ruta biosintética de flavonoides y antocianinas: dihidroflavonol 4-reductasa (DFR), flavonol sintasa (FLS) y flavonoides 3'-hidroxilasa (F3'H) y las enzimas de carotenoides: licopeno β -ciclase (LCYB) y zeaxantina epoxidasa (ZEP), permitieron determinar el aumento o disminución de la actividad de las enzimas para la obtención de distintos colores.
- El análisis de la región promotora permitió la selección de los factores de transcripción activadores AT1G29160 y AT2G06200 y represores AT1G51600 y AT1G09030, para el modelamiento matemático.
- Se determinó que la constante de disociación, la tasa de degradación y la tasa transcripcional de los activadores y represores son importantes para el diseño de la ecuación matemática.
- En conclusión, el modelamiento matemático es una herramienta que permite simular la expresión enzimática de las rutas biosintéticas, tanto en aumento o en

disminución de las enzimas, las cuales son responsables de la coloración de los pétalos para la obtención de una gran diversidad de colores en rosas.

Capítulo 6: Recomendaciones

- Se deben generar bases de datos metabólicas y genómicas del género *Rosa*, que permitan obtener información útil para el mejoramiento genético de los cultivos de las rosas.
- Se sugiere analizar nuevas secuencias reguladoras de la expresión génica para la búsqueda de otros activadores y represores localizadas a partir del extremo 3'.
- Se recomienda replicar el modelamiento matemático incrementando la cantidad de los metabolitos secundarios, así como las diferentes condiciones iniciales para tratar de mejorar y ajustar este modelo.
- Es importante realizar ensayos *in vitro* para determinar la eficiencia del modelo matemático planteado en la variabilidad de colores en pétalos de rosas.

Capítulo 7: Bibliografía

- Aggarwal, D., Kumar, S., Kumar, K., Schrawatm, N., Singh, H., & Singh, R. (2020). Effects of plant growth regulators on *in vitro* propagation of economically important ornamental plant *Rosa hybrida* L. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*.
- Alon, U. (2019). An introduction to systems biology: Design principles of biological circuits. *CRC Computational Biology Series*.
- Alonso, M. (2011). Conocimiento y bases de datos: Una propuesta de integración inteligente. *Universidad de Cantabria*.
- Anand, A., Arulmoli, R., & Parasuraman, S. (2016). Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacogn. Rev.*
- Ay, A., & Arnosti, D. (2011). Mathematical modeling of gene expression: a guide for the perplexed biologist.
- Banco Central del Ecuador. (2019, Abril 25). *Boletín Anuario. Banco Central Del Ecuador*. Retrieved from <https://contenido.bce.fin.ec/documentos/PublicacionesNotas/Catalogo/Anuario/Anuario32/IndiceAnuario36.htm>
- Bendahmane, M., Dubois, A., Raymond, O., & Bris, M. (2013). Genetics and genomics of flower initiation and development in roses. *Journal of Experimental Botany*.
- Ben-Meir, H., Zuker, A., Weiss, D., & Vainstein, A. (2003). Molecular control of floral pigmentation: anthocyanins. *Breeding for Ornamentals*.
- Bottani, S., & Veitia, R. (2008). Hill function-based models of transcriptional switches: impact of specific, nonspecific, functional and nonfunctional binding. *Biological Reviews*.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2010). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*.

- Carrión, M. (2018). Internationalization strategies in the ecuadorian flower industry. *HEC MONTRÉAL*.
- Deineka, L., Deineka, V., Tokhtar, V., & Martynova, N. (2015). Rose flower petals: rich source of anthocyanins. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 944-950.
- Ehsan, F., & Hasan, A. (2018). A method for estimating Hill function-based dynamic models of gene regulatory networks. *Royal Society Open Science*.
- EXPOFLORES. (2019). Informa anual de exportaciones. *CIM*.
- FAO. (2017, 01 26). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Retrieved from <http://www.fao.org/in-action/agronoticias/detail/es/c/505965/>
- Flores, E. (2015). Respuesta del cultivo de rosa (*Rosa sp.*), a tres fuentes de fosfitos en aplicación al suelo y follaje como inductores de resistencia y calidad de flor. Ayora, Pichincha. *Universidad Central del Ecuador*.
- Fougère-Danezan, M., Joly, S., Bruneau, A., Gao, X.-F., & Zhang, L.-B. (2015). Phylogeny and biogeography of wild roses with specific attention to polyploids. *Annals of Botany*, 275–291.
- Gómez, C., & Agustín, E. (2017). Análisis histórico del sector florícola en el Ecuador y estudio del mercado para determinar su situación actual. *Universidad San Francisco de Quito*.
- Guallasamín, W. (2017). Calculadora de huella de carbono para el cultivo de rosas comparando GHG Protocol Vs. PAS 2050: Caso de estudio EcoRoses S.A. *Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE*.
- Hair, C. (2019). Roses along the Equator: Situating Ecuador and Colombia within the global cut-flower market. *Project Muse*.

- Hojjati, Y., Shoor, M., Tehranifar, A., & Abedi, B. (2019). Modification of flower color pigments and color composition with hormonal treatments and sucrose in *Tulipa gesneriana* 'Kingsblood'. *Journal of Ornamental Plants*.
- Hubank, M. (2004). Gene expression profiling and its application in studies of haematological malignancy. *British Journal of Haematology*.
- Iwashina, T., Yamaguchi, M.-a., Nakayama, M., Onozaki, T., Yoshida, H., Kawanobu, S., . . . Okamura, M. (2010). Kaempferol glycosides in the flowers of carnation and their contribution to the creamy white flower color. *Natural Product Communications*.
- Katsumoto, Y., Fukuchi-Mizutani, M., Fukui, Y., Brugliera, F., Holton, T., Pigeaire, A., . . . Tanaka, Y. (2007). Engineering of the Rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated Blue-hued flowers accumulating Delphinidin. *Plant Cell Physiology*, 1589–1600.
- Kawamura, K., Hibrand-Saint, L., Thouroude, T., Jeauffre, J., & Foucher, F. (2015). Inheritance of garden rose architecture and its association with flowering behaviour. *Tree Genetics & Genomes*.
- Kumar, N., Bhandari, P., Singh, B., Gupta, A. P., & Kaul, V. K. (2008). Reversed phase-HPLC for rapid determination of polyphenols in flowers of rose species*. *Journal of Separation Science*, 262 – 267.
- Li, S., Zhong, M., Dong, X., Jiang, X., Xu, Y., Sun, Y., . . . Hu, J.-Y. (2018). Comparative transcriptomics identifies patterns of selection in roses. *BMC Plant Biology*.
- Li, Z., Zhao, M., Jin, J., Zhao, L., & Xu, Z. (2018). 19) Anthocyanins and their biosynthetic genes in three novel-colored *Rosa rugosa* cultivars and their parents. *Plant Physiology and Biochemistry*.
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., & Shafee, T. (2017). Transcriptomics technologies. *PLOS Computational Biology*.

- Lu, S., & Li, L. (2008). Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. *Journal of Integrative Plant Biology*.
- Lyll, A. (2013). Las negociaciones en turno a estándares de comercio justo dentro de florícolas ecuatorianas. *Eutopía: Revista de Desarrollo Económico Territorial*, 47-58.
- Miller, R., Owens, S., & Rørslett, B. (2009). Plants and colour: Flowers and pollination. *Optics & Laser Technology*.
- Mohammad, S., Šamec, D., Tomczyk, M., Milella, L., Russo, D., Habtemariam, S., . . . Yousefi, B. (2018). Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. *Biotechnology Advances* .
- Muñoz, M. (2020). Análisis costo-beneficio de la implementación de buenas prácticas ambientales en el sector florícola de Ecuador: Caso Florícola Angy Roses. *Pontificia Universidad Católica del Ecuador*.
- Nishihara, M., & Nakatsuka, T. (2010). Genetic engineering of flavonoid pigments to modify flower color in floricultural plants. *Springer*.
- Noman, A., Aqeel, M., Deng, ..., Khalid, N., Sanaulah, T., & Shuilin, H. (2017). Biotechnological advancements for improving floral attributes in ornamental plants. *Frontiers in Plant Science*.
- Nowak, R., Olech, M., Pecio, Ł., Oleszek, W., Los, R., Malm, A., & Rzymowska, J. (2013). Cytotoxic, antioxidant, antimicrobial properties and chemical composition of rose petals. *Wiley Online*.
- Ono, M., & Iwashina, T. (2014). Quantitative flavonoid variation accompanied by change of flower colors in *Edgeworthia chrysantha*, *Pittosporum tobira* and *Wisteria floribunda*. *Natural Product Communication*.

- Patra, B., Schluttenhofer, C., Wu, Y., Sitakanta, P., & Yuan, L. (2013). Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*.
- Qi, W., Chen, X., Fang, P., Shi, S., Li, J., Liu, X., . . . Zhang, Z. (2018). Genomic and transcriptomic sequencing of *Rosa hybrida* provides microsatellite markers for breeding, flower trait improvement and taxonomy studies. *BMC Plant Biol*.
- Raymond, O., Gouzy, J., Just, J., Badouin, H., Verdenaud, M., Lemainque, A., . . . Cottret, L. (2018). The *Rosa* genome provides new insights into the domestication of modern roses. *Nature Genetics*.
- Reyes, R. (2016). Evaluación de inductores externos de la activación del sistema inmunológico en el cultivo de Rosa (*Rosa* sp.). *Universidad Técnica de Ambato*.
- Salazar, F. (2017). Respuesta a tres programas de fertilización en el cultivo de rosa (*Rosa* sp.) Var. Freedom. *Universidad Central del Ecuador*.
- Sarangowa, O., Kanazawa, T., Nishizawa, M., Myoda, T., Bai, C., & Yamagishi, T. (2014). Flavonol glycosides in the petal of *Rosa* species as chemotaxonomic markers. *Phytochemistry*, 61-68.
- Schieber, A., Mihalev, K., Berardini, N., Mollov, P., & Carle, R. (2005). Flavonol glycosides from distilled petals of *Rosa damascena* Mill. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, 379-384.
- Schmitzer, V., Mikulic-Petkovsek, M., & Stampar, F. (2019). Traditional rose liqueur – A pink delight rich in phenolics. *Food Chemistry*, 434-440.
- Schmitzer, V., Veberic, R., & Stampar, F. (2012). 15) Prohexadione-Ca application modifies flavonoid composition and color characteristics of rose (*Rosa hybrida* L.) flowers. *Scientia Horticulturae*, 14-20.

- Schmitzer, V., Veberic, R., Osterc, G., & Stampar, F. (2009). Changes in the phenolic concentration during flower development of rose 'KORcrisett'. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 491–496.
- Schulz, D., Schott, R., Voorrips, R., Smulders, M., Linde, M., & Debener, T. (2016). Genome-wide association analysis of the anthocyanin and carotenoid contents of Rose petals. *Frontiers in Plant Science*.
- Shah, P., Priya, V., & Gayathri, R. (2016). Quercetin - A flavonoid: A systematic review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*.
- Stolker, R. (2010). Tools to determine petal color in a segregating population: Rose petal color determination. *Plant Research Internacional*.
- Sun, Y., Wang, W., Zhao, L., Zheng, C., & Ma, F. (2019). Changes in volatile organic compounds and differential expression of aroma-related genes during flowering of *Rosa rugosa* 'Shanxian'. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*.
- Tanaka, Y., Brugliera, F., Kalc, G., Senior, M., Dyson, B., Nakamura, N., . . . Chandler, S. (2011). Flower color modification by Engineering of the flavonoid biosynthetic pathway. *Korean journal of horticultural science and technology*.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., & Ohmiya, A. (2009). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoides. *The Plant Journal*.
- The Arabidopsis Information Resource. (23 de Diciembre de 2020). *The Arabidopsis Information Resource*. Obtenido de <https://www.arabidopsis.org/index.jsp>
- Trabelsi, H., Koch, M., & Faulon, J.-L. (2018). Building a minimal and generalizable model of transcription-factor based biosensors: showcasing flavonoids. *Biotechnology & Bioengineering*.

- Van den Bulcke, T., Koenraad, V., Naudts, B., Remortel, P., Ma, H., Verschoren, A., . . .
Marchal, K. (2007). SynTReN: a generator of synthetic gene expression data for design
and analysis of structure learning algorithms. *BioMed Central Bioinformatics*.
- Waliczek, T., Byrne, D., & Holeman, D. (2018). Opinions of landscape roses available for
purchase and preferences for the future market. *HorTechnology*.
- Wan, H., Yu, C., Han, Y., Guo, X., Luo, L., Pan, H., . . . Zhang, Q. (2019). Determination of
flavonoids and carotenoids and their contributions to various colors of Rose cultivars
(*Rosa* spp.). *Frontiers in Plant Science*.
- Yeon, Y., & Kim, W. (2020). Floral pigment scent associations in eight cut rose cultivars with
various petal colors. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 633–641.

Capítulo 8: Anexos