

MICROPROPAGACIÓN DEL LIRIO AMAZÓNICO (*Eucharis grandiflora* Planch. & Linden) MEDIANTE ORGANOGENESIS DIRECTA

MICROPROPAGATION OF AMAZON LILY (*Eucharis grandiflora* Planch. & Linden) THROUGH DIRECT ORGANOGENESIS

Guerrero-Valencia, F.A.; J.L. Rodríguez-de la O, M. De J. Juárez-Hernández, J. Ayala-Arreola y G. Ramírez-González

MICROPROPAGACIÓN DEL LIRIO AMAZÓNICO (*Eucharis grandiflora* Planch. & Linden)
MEDIANTE ORGANOGENESIS DIRECTA.

MICROPROPAGATION OF AMAZON LILY (*Eucharis grandiflora* Planch. & Linden)
THROUGH DIRECT ORGANOGENESIS.

MICROPROPAGACIÓN DEL LIRIO AMAZÓNICO (*Eucharis grandiflora* Planch. & Linden) MEDIANTE ORGANOGÉNESIS DIRECTA.

MICROPROPAGATION OF AMAZON LILY (*Eucharis grandiflora* Planch. & Linden) THROUGH DIRECT ORGANOGENESIS.

Guerrero-Valencia, F.A.;
J.L. Rodríguez-de la O,
M. De J. Juárez-Hernández,
J. Ayala-Arreola y
G. Ramírez-González

MICROPROPAGACIÓN DEL
LIRIO AMAZÓNICO
(*Eucharis grandiflora* Planch.
& Linden) MEDIANTE
ORGANOGENESIS
DIRECTA

MICROPROPAGATION OF
AMAZON LILY (*Eucharis
grandiflora* Planch. & Linden)
THROUGH DIRECT
ORGANOGENESIS

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 51: 141-153. Enero 2021

DOI:
10.18387/polibotanica.51.9

F.A. Guerrero-Valencia / guerrerofranco066@gmail.com

J.L. Rodríguez-de la O

M. De J. Juárez-Hernández

J. Ayala-Arreola

G. Ramírez-González

Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo.
Carretera México-Texcoco, Km 38.5, Chapingo, Estado de México, CP 56230.

RESUMEN: El lirio amazónico (*Eucharis grandiflora* Planch. & Linden) es una planta geófito de uso ornamental y se propaga a través de la división de brotes adventicios. No obstante, este método es limitado, debido a que un bulbo produce solo dos o tres hijuelos después de un año de cultivo, por lo que el objetivo de esta investigación fue elaborar una metodología que permita la micropropagación de esta especie mediante organogénesis directa, y de este modo incrementar el número de plántulas nuevas en sistemas comerciales. Durante el establecimiento *in vitro*, se usaron explantes de 0.5 X 1.0 cm conformados por una porción del catáfilo y del disco basal y se cultivaron en el medio de Murashige & Skoog (MS) suplementado con 2.0 ml·L⁻¹ de Plant Preservative Mixture (PPM™). Para la inducción y multiplicación de brotes adventicios se evaluó el efecto de la 6-bencil-aminopurina (BAP) en concentraciones de 0.0, 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 mg·L⁻¹ y se determinó el número de brotes cada siete días. Los brotes obtenidos se subcultivaron en un medio sin reguladores para promover su desarrollo, y se evaluó el contenido de sacarosa en concentraciones de 30 a 70 g·L⁻¹. Para el enraizamiento, se utilizó ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB) y ácido α -naftalenacético (ANA), en concentraciones de 0.3 y 1.0 mg·L⁻¹. Las condiciones de incubación fueron un fotoperiodo de 16 horas luz y ocho horas de oscuridad, a una temperatura de 25 \pm 2 °C y una intensidad luminosa de 50 μ mol·m⁻²·s⁻¹. Los brotes enraizados se aclimataron en contenedores con turba de musgo y se mantuvieron en un invernadero de cristal con sombra al 50%. En el establecimiento se obtuvo una contaminación del 30%. Durante la multiplicación, el uso de 3.0 mg·L⁻¹ BAP produjo un máximo de 3.8 brotes por explante a los 35 días después de la siembra. El mejor desarrollo de los brotes se obtuvo con 50 g·L⁻¹ de sacarosa. En el enraizamiento, el AIA y AIB (0.3 mg·L⁻¹) produjeron una mayor longitud de raíces. Durante la aclimatación se obtuvo un 100% de sobrevivencia a los 50 días después del trasplante y aclimatación.

Palabras clave: Amaryllidaceae, biotecnología, propagación, bulbo.

ABSTRACT: Amazon lily (*Eucharis grandiflora* Planch. & Linden) is a geophyte plant for ornamental use and it is propagated through the division of adventitious shoots. However, this method is limited, because a bulb produces only two or three offspring after one year of cultivation, so the objective of this research was to develop a methodology that allows the micropropagation of this species through direct organogenesis and thus increase the number of new seedlings in commercial systems. During the *in vitro* establishment, there were used 0.5 X 1.0 cm explants conformed by a portion of the scale and basal disk and they were cultivated in Murashige & Skoog

medium (MS) supplemented with 2.0 ml·L⁻¹ of Plant Preservative Mixture (PPM™). For the induction and multiplication of adventitious shoots, the effect of 6-benzyl-aminopurine (BAP) was evaluated in concentrations of 0.0, 0.1, 0.3, 1.0 and 3.0 mg·L⁻¹ and the number of new shoots every week was determined. The shoots obtained were subcultured in a medium without regulators to promote their development, and the sucrose content was evaluated in concentrations of 30 to 70 g·L⁻¹. For rooting, indol-3-acetic acid (AIA), indol-3-butyric acid (AIB), and α -naphthaleneacetic acid (ANA) were used, in concentrations of 0.3 and 1.0 mg·L⁻¹. Incubation conditions were a photoperiod of 16 light hours and 8 dark hours, at a temperature of 25 ± 2 °C and a light intensity of 50 μ mol·m⁻²·s⁻¹. The rooted shoots were acclimatized in pots with peat moss and were kept in a glass greenhouse with 50% shade. In the establishment, contamination of 30% was obtained. During multiplication, the use of 3.0 mg·L⁻¹ BAP produced a maximum of 3.8 shoots per explant 35 days after culture. The best development of shoots was obtained with 50 g·L⁻¹ of sucrose. In rooting, AIA, and AIB (0.3 mg·L⁻¹) produced a greater root length. During acclimatization, 100% survival was obtained 50 days after transplanting and acclimatization.

Key words: Amaryllidaceae, biotechnology, propagation, bulb.

INTRODUCCIÓN

El lirio amazónico (*Eucharis grandiflora* Planch. & Linden) es una planta geófito perenne que pertenece a la familia de las Amarilidáceas. Es originaria de Centro y Sudamérica, donde se encuentra desde Guatemala hasta Bolivia, con una distribución predominante en Colombia y Ecuador (Yusti-Muñoz & Velandia-Perilla, 2013). Esta especie se encuentra adaptada a las selvas húmedas y a condiciones de baja luminosidad (Meerow, 1989; Meerow, Jost, & Oleas, 2015).

Generalmente se cultiva en macetas grandes y también en invernaderos, o como plantas de interior. Los cultivadores las siembran por sus flores encantadoras, de color blanco puro y muy aromáticas (Van Dijk & Kurpershoek, 2003). Además, posee unas hojas de color verde intenso, las cuales son muy atractivas, lo que la convierte en una planta cultivada también por su follaje (Evangelista-Lozano *et al.*, 2015).

La propagación convencional de esta planta suele realizarse por división de bulbillos adventicios que se originan naturalmente en el bulbo subterráneo de la planta madre, los cuales son removidos y replantados en el suelo o en un nuevo contenedor (Beyl & Trigiano, 2015; Davies, Geneve, Wilson, Hartmann, & Kester, 2018). Sin embargo, este método de propagación es deficiente, debido a que un bulbo madre produce solo dos o tres hijuelos después de un año de cultivo (Bach & Sochacki, 2012; Çiğ & Başdoğan, 2015). Aunado a esto, la propagación sexual en esta especie es limitada, debido a que sus semillas no son viables (Evangelista-Lozano *et al.*, 2015; Meerow, 1989). Por lo tanto, se requieren de otras alternativas que permitan obtener un mayor número de plantas en sistemas de producción comerciales.

Una alternativa es la micropropagación, técnica que ha sido probada exitosamente en la propagación masiva de varias especies vegetales que presentan limitaciones importantes (Anis & Ahmad, 2016; Cardoso, Sheng Gerald, & Teixeira da Silva, 2018). En especies de la familia Amaryllidaceae, el uso de esta estrategia se encuentra ampliamente documentado (El Tahchy *et al.*, 2011; Juan-Vicedo, Pavlov, Ríos, & Casas, 2019; Rahimi Khonakdari, Rezadoost, Heydari, & Mirjalili, 2020; Zayed, El-Shamy, Berkov, Bastida, & Codina, 2011), aunque en lirio amazónico los reportes son escasos y se han centrado en el estudio de algunos factores que intervienen durante la regeneración de brotes adventicios, como el tamaño y la orientación de los explantes (escamas dobles y pedicelos), la concentración de las sales inorgánicas del medio de cultivo, la temperatura y el fotoperiodo (Hasegawa, Takigawa, & Tokuzumi, 1995; Pierik, Sprenkels, & van Bragt, 1983), así como también aquellos que participan durante la embriogénesis somática (Mujib, Banerjee, & Ghosh, 2005; Mujib, Banerjee, Maqsood, &

Ghosh, 2013). El objetivo de esta investigación fue elaborar una metodología que permita la micropropagación de esta especie mediante organogénesis directa con el fin de incrementar las tasas de propagación y obtener material homogéneo.

MÉTODOS

Material vegetal

Como material vegetal, se utilizaron plantas de lirio amazónico cultivadas en macetas y dentro de un invernadero con sombra (fig. 1A). Para obtener los explantes, se emplearon cinco bulbos, con un diámetro entre 4.5 y 5.5 cm, a los cuales se les removieron las raíces, hojas y los catáfilos más externos y necrosados, lavándolos con agua corriente y detergente comercial hasta quedar completamente blancos y sin restos de sustrato. Después de extraídos los bulbos, se les cortó la parte superior, se dividieron longitudinalmente en cuatro partes y cada parte resultante se fraccionó una vez más, hasta obtener ocho partes.

Desinfestación

Las fracciones obtenidas se lavaron vigorosamente en una solución con detergente comercial (Roma[®]) y 2 ml·L⁻¹ de Tween[®] 20. Seguido de esto se sumergieron en una solución de etanol al 70% durante tres minutos. Posteriormente se colocaron en una solución de cloro comercial (hipoclorito de sodio 4-6%) al 20% durante 15 minutos. Después se llevaron a una solución con Fungimycin 500[®] (1 g·L⁻¹) durante 12 minutos. Luego de esto, se transfirieron a una solución de peróxido de hidrógeno al 30% durante 12 minutos, y una vez transcurrido este tiempo se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Finalmente, las fracciones del bulbo se trasladaron inmersas en una solución de ácido cítrico (150 mg·L⁻¹) y ácido ascórbico (100 mg·L⁻¹) a una cámara de flujo laminar para obtener los explantes.

Medio de cultivo

Como medio básico se utilizaron las sales inorgánicas del medio MS (Murashige & Skoog, 1962) al 100% suplementadas con 0.40 mg·L⁻¹ de tiamina, 100 mg·L⁻¹ de Myo-inositol, 80 mg·L⁻¹ de L-cisteína y 30 g·L⁻¹ de sacarosa. El pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 con NaOH o HCl, se gelificó con 7 g·L⁻¹ de agar y se distribuyó en tubos de ensayo de 25 x 150 mm a un volumen de 20 ml de medio por cada tubo. La esterilización se realizó en autoclave a 121 °C y 1.5 kgf·cm⁻² durante 15 minutos. Durante cada etapa del experimento se añadieron distintos reguladores de crecimiento, de acuerdo con las respuestas deseadas.

Establecimiento *in vitro* y condiciones de cultivo

El establecimiento *in vitro* se realizó en una cámara de flujo laminar. Se seccionaron los fragmentos de bulbo en fragmentos rectangulares de 0.5 X 1.0 cm, cuidando de que el explante estuviera conformado por una porción del catáfilo y del disco basal (escama sencilla). Los explantes se colocaron en tubos de ensayo de 25 X 150 mm, y se mantuvieron en un cuarto de incubación con un fotoperiodo de 16 horas luz y ocho horas de oscuridad, a una temperatura de 25 ± 2 °C y una intensidad luminosa de 50 μmol·m⁻²·s⁻¹. Durante esta etapa se utilizó un medio de cultivo básico, con 2.0 ml·L⁻¹ de Plant Preservative Mixture (PPMTM) y otro sin PPMTM como testigo (100 explantes por cada tratamiento). Se evaluó el porcentaje de contaminación a los 14 días después de la siembra (DDS).

Inducción y multiplicación de brotes

Durante esta etapa, se evaluó el efecto de la 6-bencilaminopurina (BAP) en cinco concentraciones: 0.0, 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 mg·L⁻¹. El medio de cultivo utilizado fue el medio básico descrito anteriormente, suplementado con 80 mg·L⁻¹ de sulfato de adenina y se sembraron cinco explantes por cada tratamiento. Se contabilizó el número de brotes a los 35 días después de la siembra (DDS).

Desarrollo de los brotes

Los brotes obtenidos durante la multiplicación, se subcultivaron en el medio básico sin reguladores de crecimiento y con distintos niveles de sacarosa, en concentraciones de 30, 40, 50, 60 y 70 g·L⁻¹ y se sembraron cinco brotes por cada tratamiento. Después de 35 días, los brotes se transfirieron a un medio de cultivo con auxinas para promover su enraizamiento. En este experimento se contabilizó la longitud de brotes, el número de raíces, la longitud de raíces, y el número de hojas cada siete días.

Enraizamiento

Se estudió el efecto de tres auxinas en el enraizamiento de los brotes micropropagados del lirio amazónico. Las auxinas evaluadas fueron: ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB), y ácido α -naftalenacético (ANA). Cada una de las auxinas se añadió al medio de cultivo en dos concentraciones diferentes (0.3 y 1.0 mg·L⁻¹), generando un total de seis tratamientos, más un testigo sin reguladores de crecimiento y se sembraron cinco brotes por cada tratamiento. Se utilizó el medio de cultivo básico, modificando la concentración de sacarosa a 50 g·L⁻¹. Durante esta etapa se contabilizó la longitud de brotes, el número y longitud de raíces, y el número de hojas cada siete días.

Trasplante y aclimatación

Para esta etapa, se utilizaron 100 plántulas obtenidas durante la etapa de enraizamiento, con una longitud entre 2.8 y 8.5 cm. Como contenedores se utilizaron vasos desechables de plástico transparentes de un litro de volumen y como sustrato se utilizó turba de musgo (fig. 1G). El sustrato se saturó con agua y se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1.5 kgf·cm⁻² durante 20 minutos.

Para esto, se retiraron las plántulas de los tubos de ensayo con la ayuda de una pinza, y se lavaron con agua corriente durante un minuto para retirar los restos del medio de cultivo. Posteriormente se enjuagaron en una solución con Benlate[®] a una dosis de 0.5 g·L⁻¹. Una vez enjuagadas, se trasplantaron en los contenedores y se cubrieron con una tapa transparente. Las plántulas se mantuvieron en un invernadero con sombra al 50% y se regaron tres veces por semana con la solución nutritiva de Steiner (1984) a la mitad de la concentración. A los 50 días después de la aclimatación se evaluó el porcentaje de supervivencia.

Diseño experimental y análisis estadístico

En cada ensayo realizado se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones, en donde cada unidad experimental consistió en un tubo de ensayo con un explante sembrado. Para el procesamiento de los datos de las variables número y longitud de brotes, número y longitud de raíces, y el número de hojas, se empleó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$). El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el software estadístico InfoStat versión 2016 (Di Rienzo *et al.*, 2016).

RESULTADOS

Establecimiento

Catorce días después de la siembra, se observó un 30% de contaminación causada por bacterias en el tratamiento con PPM[™], mientras que en el testigo fue del 50%, en el que se observó el crecimiento tanto de hongos como de bacterias, lo cual sugiere que este compuesto ayuda controlar la presencia de microorganismos y así obtener un ambiente aséptico en los medios de cultivo.

Smith, Burrows, & Kurten (1999) y de Klerk (2012) señalan que el principal reto asociado con el cultivo de tejidos en plantas bulbosas es la contaminación endógena durante la etapa de establecimiento, debido a que el uso de órganos subterráneos como fuente de explantes,

frecuentemente está asociado con una alta presencia de microorganismos contaminantes (de Klerk, 2012; Ziv & Lilien-Kipnis, 2000).

Inducción y multiplicación de brotes

La formación de brotes adventicios fue evidente en la región donde la escama se une con el disco basal a partir de los 14 DDS (fig. 1B) mediante organogénesis directa. El 80% de los explantes generaron nuevos brotes adventicios. Estos resultados coinciden con lo reportado por Cázarez-Prado *et al.* (2010) y Hong & Lee (2012), quienes observaron la generación de nuevos brotes en esta región de los explantes. Cázarez-Prado *et al.* (2010) también mencionan que cuando las escamas no presentan el fragmento del disco basal no se presenta brotación y sólo se hinchan.

Se encontraron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) en cuanto al número de brotes por explante a los 35 DDS (Cuadro 1). Se dio un aumento significativo en el número de brotes a partir de la adición de $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP al medio de cultivo con respecto al testigo, así como también una disminución en el tamaño de los brotes (fig. 1D y E). La adición de $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP produjo un mayor número de brotes (más de tres veces) con respecto al testigo, en el cual se obtuvo la menor respuesta.

Cuadro 1. Efecto de la concentración de BAP en la multiplicación de brotes en explantes de lirio amazónico a los 35 DDS en condiciones *in vitro*.

BAP ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Número de brotes
0.0	1.20 ± 0.20 c
0.1	1.40 ± 0.24 c
0.3	2.80 ± 0.20 b
1.0	3.20 ± 0.20 ab
3.0	3.80 ± 0.20 a

Medias con una letra común son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). Diferencia mínima significativa: 0.88. Los datos son medias \pm error estándar.

En *Traubia modesta* (Phil.) Ravenna, Paredes *et al.* (2014) reportan 2.47 brotes por explante con $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP y $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA. Vargas, Oropeza, & de García (2006) obtuvieron 3.75 brotes en explantes de *Hippeastrum* sp. con la adición de $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP. Pierik, Sprengels, & van Bragt (1983) también obtuvieron resultados similares en *Eucharis grandiflora* Planch. & Linden con la adición de AIB en lugar de BAP durante la multiplicación *in vitro*. Por otro lado, en el caso de *Muscari muscarimi* Medikus, Ozel, Khawar, & Unal (2015) obtuvieron 19 brotes con $4.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP y $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA.

Desarrollo *in vitro* de los brotes

La concentración de sacarosa en el medio de cultivo afectó el desarrollo *in vitro* de los brotes de lirio amazónico a los 35 DDS (Cuadro 2). En el caso del número de hojas se dio un efecto significativo ($P \leq 0.05$) mientras que en la longitud de brotes y raíces fue altamente significativo ($P \leq 0.01$). En el caso del número de raíces no se observaron diferencias significativas ($P \geq 0.05$).

Se observó una respuesta favorable en los brotes al aumentar la concentración de sacarosa de 30 a 40 y $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, en donde se pudo observar que fue el punto máximo para la longitud de brotes. Al aumentar la concentración a 60 y $70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ se pudo observar un efecto negativo, ya que los

brotos tendieron a generar una menor longitud con respecto al tratamiento con 50 g·L⁻¹. El número de hojas y la longitud de raíces comenzó a disminuir con 70 g·L⁻¹ de sacarosa.

Resultados similares encontraron Cázarez-Prado *et al.* (2010) quienes observaron en *Sprekelia formosissima* (L.) Herb. que una concentración entre 40 y 50 g·L⁻¹ de sacarosa promueve un mayor vigor de los brotes expresado en un diámetro de bulbo más grande y un mayor número de hojas por brote. Sultana *et al.* (2010) observaron una tendencia similar en brotes de *Hippeastrum hybridum* Hort. al incrementar la concentración de sacarosa hasta 90 g·L⁻¹, posteriormente se dio una disminución en el peso fresco de los brotes. De Bruyn, Ferreira, Slabbert, & Pretorius (1992) demostraron que se requiere una cierta concentración de sacarosa para la regeneración de brotes, sin embargo, alto contenido de este carbohidrato en el medio de cultivo tiene efectos negativos en el potencial de regeneración de los explantes. Por otro lado, Tipirtamaz (2003) encontró que el uso de sacarosa en concentraciones de 30 a 60 g·L⁻¹ no tuvo un efecto significativo en el desarrollo de bulbos de *Galanthus ikariae* Baker.

Cuadro 2. Efecto de la concentración de sacarosa en el desarrollo *in vitro* de brotes de lirio amazónico a los 35 DDS.

Sacarosa (g·L ⁻¹)	Longitud de brotes (mm)	Número de raíces	Longitud de raíces (mm)	Número de hojas
30	35.2 ± 3.2 b	4.8 ± 0.5 a	12.4 ± 1.4 bc	2.0 ± 0.1 a
40	55.8 ± 3.8 a	3.2 ± 0.9 a	23.4 ± 2.5 a	2.0 ± 0.1 a
50	58.6 ± 3.9 a	3.2 ± 0.6 a	25.2 ± 2.9 a	2.0 ± 0.1 a
60	32.0 ± 4.6 b	3.8 ± 0.6 a	22.6 ± 3.6 ab	1.8 ± 0.2 ab
70	26.8 ± 3.0 b	4.2 ± 0.9 a	11.6 ± 1.4 c	1.4 ± 0.2 b
DMS	15.85	2.93	10.70	0.59

Medias en una columna con una letra común son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). DMS: Diferencia mínima significativa. Los datos son medias ± error estándar.

Enraizamiento de brotes

Durante esta etapa se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) por efecto de los tratamientos en el número de hojas, mientras que, en la longitud de brotes, número de raíces y longitud de raíces fueron altamente significativas ($P \leq 0.01$).

La formación de raíces ocurrió a los 7 DDS en el testigo y en los tratamientos con AIA y AIB, mientras que en los tratamientos con ANA comenzó a los 15 DDS. A los 21 DDS, el porcentaje de enraizamiento en todo el experimento fue del 100%.

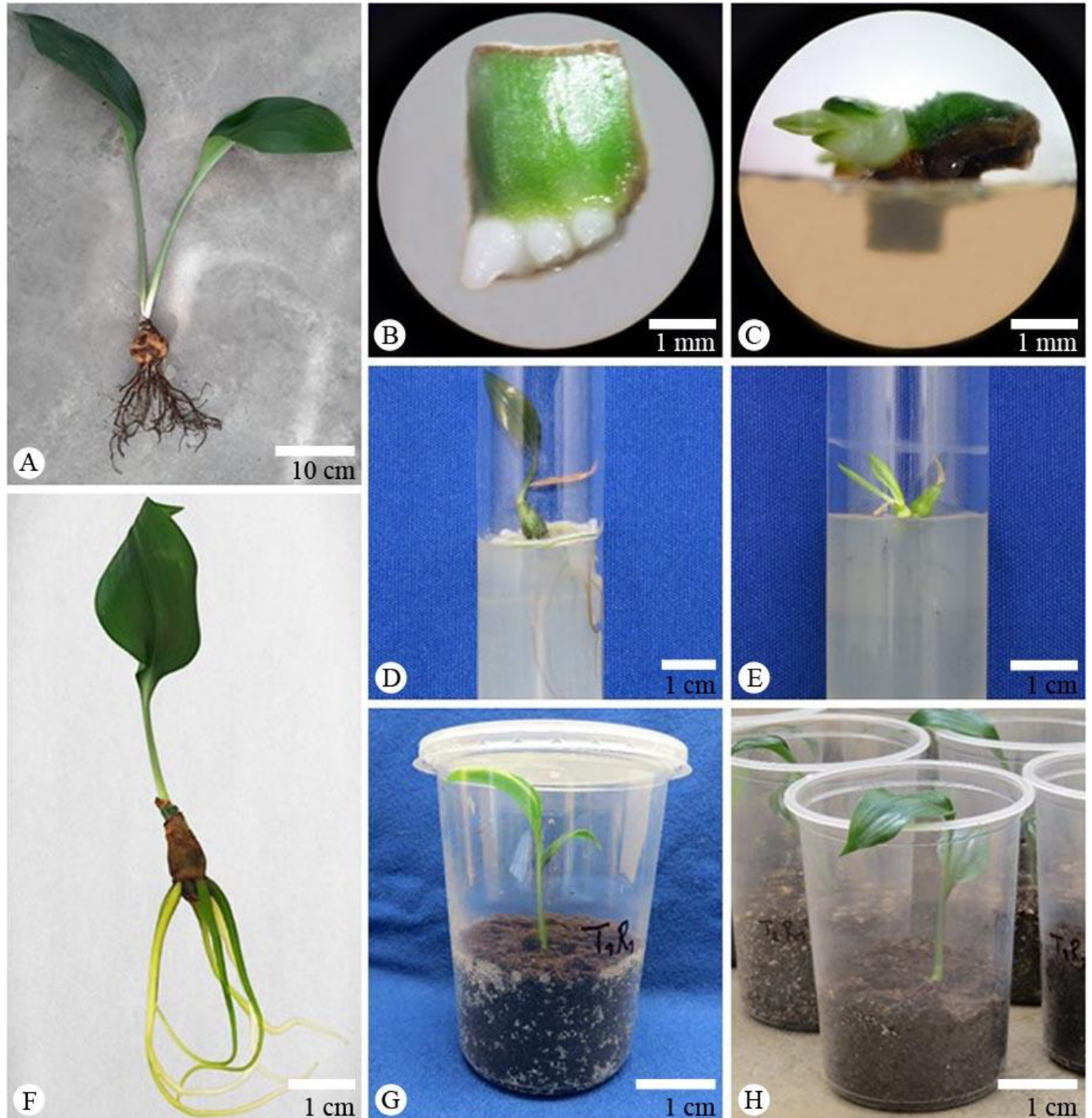


Fig. 1. Propagación *in vitro* del lirio amazónico. (A) planta madre como fuente de explantes, (B) explante con brotes múltiples a los 14 DDS, (C) explante con brotes múltiples a los 45 DDS, (D) explante en multiplicación sin reguladores de crecimiento a los 60 DDS, (E) explante en multiplicación con $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAPa los 60 DDS, (F) enraizamiento *in vitro* con $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIA a los 49 DDS, (G) contenedor utilizado durante la aclimatización, (H) plántula a los 50 días después de la aclimatización.

Al suplementar el medio de cultivo con auxinas se observó una pérdida en la longitud de los brotes. En el caso del AIA en las dos concentraciones que se utilizaron, se produjo una ligera reducción de la longitud de brotes del 8.4% a una dosis de $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, mientras que al incrementar a $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ esta reducción fue de 15.7% con respecto al testigo, aunque sin presentarse diferencias significativas. En el caso del AIB esta reducción en la longitud de brotes fue del 11.4% con una dosis de $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sin diferencias significativas con respecto al testigo, mientras que con $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, las plántulas fueron un 33.6% significativamente más pequeñas que el testigo. En el caso del ANA, esta reducción en la longitud fue más notoria, ya que las plántulas fueron un 58.7% más cortas con $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y 67.4% con $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, además en ambos casos se llegó a presentar pérdida de hojas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de tres auxinas en el desarrollo y enraizamiento *in vitro* de brotes de lirio amazónico a los 35 DDS.

Tratamiento ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Longitud de brotes (mm)	Número de raíces	Longitud de raíces (mm)	Número de hojas
AIA 0.3	53.7 ± 2.4 ab	4.4 ± 0.4 c	35.6 ± 1.0 a	1.4 ± 0.2 ab
AIA 1.0	49.4 ± 3.5 ab	5.0 ± 0.4 c	26.9 ± 2.1 ab	1.4 ± 0.2 ab
AIB 0.3	51.9 ± 4.5 ab	4.6 ± 0.4 c	34.6 ± 2.8 a	1.6 ± 0.2 a
AIB 1.0	38.9 ± 5.3 bc	4.4 ± 0.2 c	20.0 ± 2.1 bc	1.2 ± 0.2 abc
ANA 0.3	24.2 ± 5.0 cd	9.2 ± 1.2 b	15.1 ± 1.1 c	0.8 ± 0.2 bc
ANA 1.0	19.1 ± 3.0 d	15.2 ± 0.7 a	12.3 ± 0.9 c	0.6 ± 0.2 c
TESTIGO	58.6 ± 3.9 a	3.2 ± 0.6 c	25.2 ± 3.0 b	1.6 ± 0.2 a
DMS	18.24	2.83	9.00	0.67

Medias en una columna con una letra común son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). DMS: Diferencia mínima significativa. Los datos son medias \pm error estándar.

El número de raíces no aumentó significativamente por la adición de AIA y AIB al medio de cultivo con respecto al testigo, no obstante, éstas fueron de mayor longitud. Por otra parte, la adición de ANA promovió un mayor número de raíces con respecto a los demás tratamientos, sin embargo, éstas fueron de menor longitud.

Estos resultados coinciden con los reportados por Pierik *et al.* (1983), quienes lograron un enraizamiento del 100% en plántulas de *Eucharis grandiflora* Planch. & Linden con y sin la adición de AIB al medio de cultivo, además, mencionan que con el uso de $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIB es posible obtener plántulas de muy buena calidad para ser transferidas al suelo. Por el contrario, en otras especies como *Sprekelia formosissima* (L.) Herb., Cázarez-Prado *et al.* (2010) reportan haber obtenido un porcentaje de enraizamiento del 56.25% sin la adición de auxinas al medio de cultivo. Hasegawa, Takigawa, & Tokuzumi (1995) reportan haber obtenido raíces en plántulas de *Eucharis grandiflora* Planch. & Linden con $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA y $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIB, además, también encontraron que la concentración de las sales inorgánicas se encuentra directamente relacionada con el número de raíces que se puedan formar.

Trasplante y aclimatación

La transferencia de las plántulas a condiciones *ex vitro* fue exitosa. A los 50 días después de haber realizado el cambio se observó un porcentaje de supervivencia del 100% (fig. 1H). El porcentaje de supervivencia observado fue igual que en *Crinum variable* (Jacq.) Herb., como señalan Fennell, Crouch, & van Staden (2001), quienes lograron obtener un 100% de

sobrevivencia al transferir las plántulas a un sustrato conformado por arena de río y turba. Baskaran & Van Staden (2013) también lograron un éxito del 100% al aclimatar plántulas de *Agapanthus praecox* Willd. obtenidas *in vitro*.

DISCUSIÓN

Con respecto a la formación de brotes adventicios en los explantes, Grootaarts, Schel, & Pierik (1981) señalan que la formación de brotes en esta región se debe a la preexistencia de meristemas axilares, los cuales se desarrollan y dan origen a nuevos brotes, y a la presencia de células meristemáticas que se multiplican mitóticamente hasta originar nuevos meristemas, por lo que esta región es esencial para el desarrollo de brotes adventicios. La organogénesis directa se dio en un menor tiempo con respecto a otras especies bulbosas, como en *Hippeastrum hybridum* Hort., en donde se requirieron más de 36 días para formar nuevos brotes (Sultana *et al.*, 2010), mientras que en *Narcissus asturiensis* (Jord.) Pugsley fue de 60 días (Santos, Fidalgo, Santos, & Salema, 2002). El incremento en el desarrollo de los brotes relacionado con el contenido de sacarosa en el medio de cultivo es atribuible a la gran disponibilidad de moléculas carbonadas para producir nuevos componentes celulares (Cázarez-Prado *et al.*, 2010), y es por eso que los carbohidratos juegan un papel muy importante durante la propagación *in vitro*, como una fuente de carbono, así también como un agente osmótico (George, Hall, & De Klerk, 2008). No obstante, y en concordancia con este experimento, Al-Khateeb (2008) menciona que los carbohidratos en altas concentraciones pueden llegar a inhibir el desarrollo de la parte aérea de las plántulas debido a un elevado potencial osmótico, el cual interfiere con la absorción de nutrimentos (Siwach, Grover, & Gill, 2011). Rodrigues-Martins, Pasqual, Martins, & Ribeira (2015) también atribuyen este efecto al potencial osmótico del medio de cultivo como resultado de añadir elevadas concentraciones de sacarosa. Se observó una reducción en la longitud de las raíces conforme se aumenta la concentración de auxinas en el medio de cultivo, por lo que es conveniente un nivel adecuado para inducir la formación de raíces de un tejido aislado (Acosta-Echeverría, Sánchez-Bravo, & Bañón-Arno, 2008). Trigiano & Gray (2004) señalan que altas concentraciones de auxinas pueden ser tóxicas, en gran parte porque estimulan la producción de etileno, el cual causa una inhibición del crecimiento.

CONCLUSIONES

El uso de PPM™ durante el establecimiento *in vitro* disminuyó la contaminación inicial en los explantes de lirio amazónico, del 50 al 30%. La formación de nuevos brotes adventicios se produjo a los 14 días después de la siembra y se obtuvo un máximo de 3.80 brotes con la adición de 3.0 mg·L⁻¹ de BAP al medio de cultivo. Con una concentración de 40 y 50 g·L⁻¹ de sacarosa los brotes y raíces fueron de mayor longitud. Es posible obtener plántulas con un buen desarrollo radical con el uso de AIA y AIB en dosis de 0.3 y 1.0 mg·L⁻¹. La aclimatación fue exitosa y se obtuvo el 100% de sobrevivencia de las plántulas a los 50 días después del trasplante. La micropropagación es una herramienta eficiente para la propagación del lirio amazónico, ya que con un bulbo madre es posible obtener hasta 133 nuevas plantas en 150 días de cultivo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, al Departamento de Fitotecnia y al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales por el apoyo brindado para la ejecución de esta investigación. A Gisela García, Rocío Zavala y Nancy Molina por la asistencia técnica otorgada en el laboratorio.

LITERATURA CITADA

- Acosta-Echeverría, M., Sánchez-Bravo, J., & Bañón-Arno, M. (2008). Auxinas. In J. Azcón-Bieto & M. Talón (Eds.), *Fundamentos de fisiología vegetal* (2nd ed., pp. 377–398). Mc Graw Hill.
- Al-Khateeb, A. A. (2008). Regulation of *in vitro* bud formation of date palm (*L.*) cv. Khanezi by different carbon sources. *Bioresource Technology*, 99(14), 6550–6555. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.070>
- Anis, M., & Ahmad, N. (2016). *Plant tissue culture: Propagation, conservation and crop improvement*. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-1917-3>
- Bach, A., & Sochacki, D. (2012). Propagation of ornamental geophytes: Physiology and management. In R. Kamenetsky & H. Okubo (Eds.), *Ornamental geophytes: From basic science to sustainable production* (pp. 261–286). <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/b12881>
- Baskaran, P., & Van Staden, J. (2013). Rapid *in vitro* micropropagation of *Agapanthus praecox*. *South African Journal of Botany*, 86, 46–50. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.01.008>
- Beyl, C. A., & Trigiano, R. N. (2015). *Plant propagation concepts and laboratory exercises* (2nd ed.). <https://doi.org/10.1201/b17340>
- Cardoso, J. C., Sheng Gerald, L. T., & Teixeira da Silva, J. A. (2018). Micropropagation in the twenty-first century. In V. M. Loyola-Vargas & N. Ochoa-Alejo (Eds.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1815, pp. 17–46). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_2
- Cázarez-Prado, M., Andrade-Rodríguez, M., Villegas-Monter, Á., Alia-Tejagal, I., Villegas-Torres, Ó. G., & López-Martínez, V. (2010). *In vitro* propagation of *Sprekelia formosissima* Herbert., a wild plant with ornamental potential. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33(3), 197–203. Retrieved from <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/33-3/2a.pdf>
- Çiğ, A., & Başdoğan, G. (2015). *In vitro* propagation techniques for some geophyte ornamental plants with high economic value. *International Journal of Secondary Metabolite*, 2(1), 27–49.
- Davies, F. T., Geneve, R. L., Wilson, S. B., Hartmann, H. T., & Kester, D. E. (2018). *Hartmann & Kester's plant propagation : principles and practices* (9th ed.). Pearson.
- De Bruyn, M. H., Ferreira, D. I., Slabbert, M. M., & Pretorius, J. (1992). *In vitro* propagation of *Amaryllis belladonna*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31(3), 179–184. <https://doi.org/10.1007/BF00036221>
- de Klerk, G. J. (2012). Micropropagation of bulbous crops: technology and present state. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 6(1), 1–8. Retrieved from [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2012/FOB_6\(SI1\)/FOB_6\(SI1\)1-8o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2012/FOB_6(SI1)/FOB_6(SI1)1-8o.pdf)
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2016). *InfoStat versión 2016*. Retrieved from <http://www.infostat.com.ar>
- El Tahchy, A., Bordage, S., Ptak, A., Dupire, F., Barre, E., Guillou, C., ... Laurain-Mattar, D. (2011). Effects of sucrose and plant growth regulators on acetylcholinesterase inhibitory activity of alkaloids accumulated in shoot cultures of Amaryllidaceae. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106(3), 381–390. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9933-7>
- Evangelista-Lozano, S., Estrada-García, M., Escobar-Arellano, S. L., Arenas-Ocampo, M. L., Camacho-Díaz, B. H., & Jiménez-Aparicio, A. R. (2015). Eucharis Grandiflora Planch. and Linden development fertirrigated with different osmotic potentials. *Journal of Plant Nutrition*, 38(4), 551–567. <https://doi.org/10.1080/01904167.2014.934467>
- Fennell, C. W., Crouch, N. R., & van Staden, J. (2001). Micropropagation of the river lily, *Crinum variabile* (Amaryllidaceae). *South African Journal of Botany*, 67(1), 74–77. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)31096-6](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)31096-6)
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). *Plant propagation by tissue culture* (3rd ed., Vol. 1). <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>

- Grootaarts, H., Schel, J. H. N., & Pierik, R. L. M. (1981). The origin of bulblets formed on excised twin scales of *Nerine bowdenii* W. Watts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1(1), 39–46. <https://doi.org/10.1007/BF02318902>
- Hasegawa, A., Takigawa, Y., & Tokuzumi, A. (1995). Propagation of *Eucharis grandiflora* Planch. by tissue culture. *Technical Bulletin of Faculty of Agriculture-Kagawa University (Japan)*, 47(1), 79–86.
- Hong, J., & Lee, A. K. (2012). Micropropagation of *Cyrtanthus* 'Orange Gem'×*C. eucallus* hybrid. *Scientia Horticulturae*, 142, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.05.016>
- Juan-Vicedo, J., Pavlov, A., Ríos, S., & Casas, J. L. (2019). *In vitro* culture and micropropagation of the Baetic-Moroccan endemic plant *Lapiedra martinezii* Lag. (Amaryllidaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 55(6), 725–732. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10031-5>
- Meerow, A. W. (1989). Systematics of the Amazon Lilies, *Eucharis* and *Caliphruria* (Amaryllidaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 76(1), 220. <https://doi.org/10.2307/2399347>
- Meerow, A. W., Jost, L., & Oleas, N. (2015). Two new species of endemic ecuadorean Amaryllidaceae (Asparagales, Amaryllidaceae, Amarylloideae, Eucharideae). *PhytoKeys*, 48(1), 1–9. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.48.4399>
- Mujib, A., Banerjee, S., & Ghosh, P. D. (2005). Origin, development and structure of somatic embryos in selected bulbous ornamentals: BAP as inducer. In A. Mujib & J. Šamaj (Eds.), *Somatic Embryogenesis. Plant Cell Monographs* (Vol. 2, pp. 15–24). https://doi.org/10.1007/7089_028
- Mujib, A., Banerjee, S., Maqsood, M., & Ghosth, P. D. (2013). Somatic Embryogenesis of Some Member Ornamental Genera of Amaryllidaceae and Allied Families: the Similarities and Differences. *The Open Horticulture Journal*, 6, 9–18. <https://doi.org/10.2174/1874840620130807001>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Ozel, C. A., Khawar, K. M., & Unal, F. (2015). Factors affecting efficient *in vitro* micropropagation of *Muscari muscarimi* Medikus using twin bulb scale. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(2), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.09.007>
- Paredes, K., Delaveau, C., Carrasco, P., Baeza, C., Mora, F., & Uribe, M. E. (2014). *In vitro* bulbing for the propagation of *Traubia modesta* (Amaryllidaceae), a threatened plant endemic to Chile. *Ciencia e Investigacion Agraria*, 41(2), 207–214. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202014000200007>
- Pierik, R. L. M., Sprenkels, P. A., & van Bragt, J. (1983). Rapid vegetative propagation of *Eucharis grandiflora in vitro*. *Acta Horticulturae*, (147), 179–186. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1983.147.25>
- Rahimi Khonakdari, M., Rezadoost, H., Heydari, R., & Mirjalili, M. H. (2020). Effect of photoperiod and plant growth regulators on *in vitro* mass bulblet proliferation of *Narcissus tazetta* L. (Amaryllidaceae), a potential source of galantamine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 142(1), 187–199. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01853-y>
- Rodrigues-Martins, J. P., Pasqual, M., Martins, A. D., & Ribeira, S. F. (2015). Effects of salts and sucrose concentrations on *in vitro* propagation of *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae). *Australian Journal of Crop Science*, 9(1), 85–91. Retrieved from http://www.cropj.com/martins_9_1_2015_85_91.pdf
- Santos, A., Fidalgo, F., Santos, I., & Salema, R. (2002). *In vitro* bulb formation of *Narcissus asturiensis*, a threatened species of the Amaryllidaceae. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77(2), 149–152. <https://doi.org/10.1080/14620316.2002.11511471>
- Siwach, P., Grover, K., & Gill, A. R. (2011). The Influence of Plant Growth Regulators, Explant Nature and Sucrose Concentration on *in vitro* Callus Growth of *Thevetia*

Recibido:
9/julio/2020

Aceptado:
12/febrero/2021

- peruviana* Schum. *Asian Journal of Biotechnology*, 3(3), 280–292. <https://doi.org/10.3923/ajbkr.2011.280.292>
- Smith, R. H., Burrows, J., & Kurten, K. (1999). Challenges associated with micropropagation of *Zephyranthes* and *Hippesastrum* sp. (Amaryllidaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 35(4), 281–282. <https://doi.org/10.1007/s11627-999-0032-y>
- Steiner, A. A. (1984). The universal nutrient solution. *6th International Congress on Soilles Culture*, 633–649. Wageningen, the Netherlands: International Society for Soilles Culture.
- Sultana, J., Sultana, N., Siddique, M. N. A., Islam, A. K. M. A., Hossain, M. M., & Hossain, T. (2010). *In vitro* bulb production in *Hippeastrum* (*Hippeastrum hybridum*). *Journal of Central European Agriculture*, 11(4), 469–474. <https://doi.org/https://doi.org/10.5513/JCEA01/11.4.867>
- Tipirtamaz, R. (2003). Rooting and acclimatization of *in vitro* micropropagated snowdrop (*Galanthus ikariae* Baker.) bulblets. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 16(2), 121–126.
- Trigiano, R. N., & Gray, D. J. (2004). *Plant development and biotechnology*. <https://doi.org/10.1201/9780203506561>
- Van Dijk, H., & Kurpershoek, M. (2003). *La enciclopedia de las plantas bulbosas*. Editorial LIBSA.
- Vargas, T. E., Oropeza, M., & de García, E. (2006). Propagación *in vitro* de *Hippeastrum* sp. *Agronomía Tropical*, 56(4), 621–626.
- Yusti-Muñoz, A. P., & Velandia-Perilla, J. H. (2013). First record of the amazon lily *Eucharis sanderi* (Amaryllidaceae) for Isla Gorgona, Colombia. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 17(1), 46–49. Retrieved from [http://190.15.17.25/boletincientifico/downloads/Boletin\(17\)1_4.pdf](http://190.15.17.25/boletincientifico/downloads/Boletin(17)1_4.pdf)
- Zayed, R., El-Shamy, H., Berkov, S., Bastida, J., & Codina, C. (2011). *In vitro* micropropagation and alkaloids of *Hippeastrum vittatum*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 47(6), 695–701. <https://doi.org/10.1007/s11627-011-9368-1>
- Ziv, M., & Lilien-Kipnis, H. (2000). Bud regeneration from inflorescence explants for rapid propagation of geophytes *in vitro*. *Plant Cell Reports*, 19(9), 845–850. <https://doi.org/10.1007/s002990000204>