

## Establecimiento *in vitro* de *Zephyranthes* spp.

Diego Müller<sup>1</sup>, Pablo García Giménez<sup>1</sup>, Andrés Travacio<sup>2</sup>, Mirian Bueno<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario. CC14. Zavalla. Santa Fe. Argentina. CP S2125ZAA e-mail: diego.muller@unr.edu.ar

<sup>2</sup>Regional Agro Insumos SA, Corrientes 729 Piso 8, Oficina 807. Rosario. Santa Fe. Argentina. CP 2000

### RESUMEN

Las plantas del género *Zephyranthes* son bulbosas, herbáceas y perennes, con gran valor ornamental, debido a que sus flores presentan gran variedad de tamaños y colores. El objetivo del presente trabajo fue establecer *in vitro* de *Zephyranthes* spp. a partir de semillas y bulbos como explantes iniciales. Las semillas se sumergieron durante 10 min en hipoclorito de sodio al 1.5%. En los bulbos se extrajeron las catáfilas exteriores y se cortaron en forma longitudinal en tantas secciones (SB) como fue posible. Se evaluaron tres métodos de desinfección: I. 1 min en etanol 90% y 20 min en hipoclorito de sodio al 1.5 %. II. 1 min en etanol 90% y tres tiempos de exposición, 10, 15 y 20 min en el fungicida Mancozeb (4 g l<sup>-1</sup>). Cada siete días se cuantificó el número de explantes contaminados con microorganismos y se calculó el porcentaje de contaminación microbiana después de 20 días de cultivo. En las semillas se cuantificó el número de semillas germinadas y se calculó el porcentaje de germinación fisiológica (protrusión de la raíz primaria) y formación de órganos. En los bulbos también se evaluó el desarrollo de brotes hasta los 20 días de cultivo. En las semillas la contaminación microbiana fue del 2% y la germinación del 95%. Se observó desarrollo de órganos tales como bulbos, raíces y hojas. Aunque se desarrollaron brotes, los métodos de desinfección de los bulbos no fueron efectivos por 100% de contaminación.

Palabras clave: desinfección, geófito, micropropagación, ornamental

## *In vitro* establishment of *Zephyranthes* spp.

### ABSTRACT

The genus *Zephyranthes* plants bulbous, herbaceous and perennial, with great ornamental value, because their flowers have a great variety of sizes and colors. The objective of the present work was to *in vitro* establish of *Zephyranthes* spp. from seeds and bulbs as initial explants. The seeds were immersed for 10 min in 1.5% sodium hypochlorite. In the bulbs, the outer catheles were removed and cut longitudinally in as many sections (SB) as possible. Three methods of disinfection were evaluated: I. 1 min in ethanol 90% and 20 min in 1.5% sodium hypochlorite. II. 1 min in 90% ethanol and three exposure times, 10, 15 and 20 min in the fungicide Mancozeb (4 g l<sup>-1</sup>). Every seven days the number of explants contaminated with microorganisms was quantified and the percentage of microbial contamination was calculated after 20 days of culture. In the seeds, the number of germinated seeds was quantified and the percentage of physiological germination (protrusion of the primary root) and organ formation were calculated. Bulbs were also evaluated for shoot development up to 20 days of culture. In the seeds microbial contamination was 2% and germination 95%. Organs such as bulbs, roots and leaves were observed. Although shoot were developed, the methods of disinfecting the bulbs were not effective for 100% contamination.

Keywords: disinfection, geophyte, micropropagation, ornamental

### INTRODUCCIÓN

La familia *Amaryllidaceae* J. St.-Hil, de distribución predominantemente pantropical, está representada por especies bulbosas bianuales o perennes (Dahlgren *et al.*, 1985). Existen aproximadamente 860 especies distribuidas en 59 géneros (Meerow y Snijman, 1998). Se encuentran principalmente en el

hemisferio sur, especialmente en África (19 géneros) y Sudamérica (28 géneros) (Meerow y Snijman, 1998). Ambas zonas se consideran centro de diversificación. El género *Zephyranthes* Herb. está incluido en la tribu *Hippeastreae* (Pax & Hoffmann) Hutch. (1931) (Meerow y Snijman, 2001) y comprende 90 especies, de las cuales 12 se distribuyen en Argentina. Se caracterizan por ser plantas

bulbosas, herbáceas y perennes, con gran valor ornamental, debido a que sus flores presentan gran variedad de tamaños y colores.

La mayoría de las especies de *Zephyranthes* se propagan vegetativamente por medio de división de bulbos. Aunque este método es efectivo, puede llegar a ser muy lento ya que en algunas especies toma dos años o más hasta que la planta florece, como describe Mujib *et al.* (2014) para *Zephyranthes rosea* Lindl.

Mediante cultivo de tejidos también se han obtenido resultados en la propagación de especies de *Zephyranthes*. Los distintos tipos de explantes y los reguladores de crecimiento juegan un rol importante en la micropropagación, una de las aplicaciones más generalizadas. Las catáfilas con una sección del disco basal (catáfilas dobles) son ampliamente usadas (Zhang *et al.*, 2013; Paredes *et al.*, 2014). La organogénesis también se ha informado a partir de explantes como pequeñas secciones de catáfilas (Han *et al.*, 2004), ápices (Shivakumar y Krishnamurthy, 2004) y cormos (Kamo *et al.*, 2014). Los explantes de la sección inferior del bulbo y segmentos completos regeneraron vástagos en *Zephyranthes grandiflora* Lindl. (Gangopadhyay *et al.*, 2010). La acción de los reguladores de crecimiento, particularmente bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA), en la inducción de vástagos fue informada en la micropropagación de otras especies bulbosas como *Polygonum tuberosum* L. (Dehdezi *et al.*, 2014) y *Fritillaria persica* L. (Kizil y Khawar, 2014). Entre varios factores, las concentraciones de reguladores de crecimiento y sacarosa, afectan directamente el éxito en la bulbificación. Este hecho implica la transferencia de los explantes a medios de cultivos con diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores a medida que se produce la regeneración de los órganos (Arulanandam *et al.*, 2015; Malik y Bach, 2016).

La prevención de la contaminación microbiana en los estadios iniciales es el mayor reto en el cultivo de tejidos de bulbos y requiere de la aplicación de varios agentes desinfectantes (Smith *et al.*, 1999). Diversos productos químicos se utilizan para desinfectar superficialmente los explantes. Con mayor frecuencia se emplea etanol (70% v/v) e hipoclorito de sodio (1-3%) y con menor frecuencia hipoclorito de calcio (6-12%) y bicloruro de mercurio (0.1-1.25%). Las concentraciones del desinfectante y el tiempo

de exposición deben ser ajustados para cada especie y tipo de explante utilizado (Roca y Mroginsky, 1991).

Si bien es factible la regeneración de plantas a partir de técnicas de cultivo *in vitro*, el potencial regenerativo depende del genotipo, del explante empleado y de las condiciones de cultivo (Apezzato *et al.*, 1999; Passos y Bernachi, 2005).

Debido a que el género estudiado es una geófito, el bulbo representa una fuente importante de explantes para su cultivo *in vitro*, además de las semillas u otras partes de la planta. Ya que su desinfección es un paso crucial para lograr el éxito en el establecimiento *in vitro* y, considerando que los bulbos están expuestos a una elevada carga microbiana por ser órganos de almacenamiento subterráneos, el objetivo del presente estudio fue establecer *in vitro* *Zephyranthes* spp. a partir de semillas y secciones de bulbos como explantes iniciales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal*

Se seleccionaron plantas de *Zephyranthes* spp. proveedoras de explantes de un lote experimental de la localidad de Funes, Santa Fe, Argentina (32° 54' 57" S, 60° 48' 29" O). El material vegetal se multiplicó en forma vegetativa en invernadero en la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario. Para los ensayos se utilizaron como explantes semillas y bulbos.

### *Medio de cultivo*

El medio de cultivo consistió en 4.4 g l<sup>-1</sup> de la base salina propuesta por Murashige y Skoog (1962) (MS) con vitaminas de Gamborg *et al.* (1976) y 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa. El pH se ajustó a 5.8 con hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl) y luego se solidificó con 8 g l<sup>-1</sup> de agar-agar. Posteriormente, se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 121 °C y 1 atm de presión.

### *Establecimiento in vitro a partir de semillas*

Las semillas se sumergieron durante 10 min en hipoclorito de sodio al 1.5%, luego se lavaron tres veces con agua destilada estéril.

Posteriormente, se colocó una semilla por frasco de vidrio de 4 cm alto x 2 cm diámetro con 1 ml de medio de cultivo. Se emplearon 100 semillas.

A los 20 días de cultivo, las semillas germinadas, se transfirieron a tubos de 12 cm alto x 3 cm de diámetro con 4 ml de igual medio de cultivo.

#### *Establecimiento in vitro a partir de bulbos*

Los bulbos se lavaron con agua corriente, se extrajeron las catáfilas exteriores y, dependiendo del tamaño del bulbo, se cortaron en forma longitudinal en tantas secciones (SB) como fue posible. Siempre se mantuvo una porción del disco basal.

Se evaluaron tres métodos de desinfección: I. 1 min en etanol 90% y 20 min en hipoclorito de sodio al 1.5 %. II. 1 min en etanol 90% y tres tiempos de exposición, 10, 15 y 20 min en el fungicida Mancozeb (4 g l<sup>-1</sup>). Se enjuagaron tres veces con agua estéril. Se realizaron tres réplicas de 10 repeticiones por tratamiento, obtenidas a partir de 25 bulbos.

#### *Condiciones de crecimiento*

Los explantes se colocaron en cuarto de crecimiento a una intensidad lumínica de 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperiodo de 16 horas diarias a 24  $\pm$  2 °C.

#### *Evaluaciones*

Para ambos tipos de explante, cada siete días se cuantificó el número de explantes contaminados con microorganismos y se calculó el porcentaje de contaminación microbiana después de 20 días de cultivo. Esto se realizó por observación directa bajo lupa binocular y microscopio óptico (400x). Además, en las semillas se cuantificó el número de semillas germinadas y se calculó el porcentaje de germinación fisiológica (protrusión de la raíz primaria) y formación de órganos. Se consideró que la radícula había protruido de la semilla cuando alcanzaba una longitud aproximada de 3 mm (López, 1995). En los bulbos también se evaluó el desarrollo de brotes hasta los 20 días de cultivo.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los métodos de desinfección empleados en las semillas fueron efectivos y permitieron el

establecimiento *in vitro* de *Zephyranthes* spp. La incidencia de contaminantes microbianos en el total de semillas utilizado fue de 2%. La contaminación estuvo ocasionada por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Este resultado coincide con lo informado por Fernández *et al.* (2008) para la especie *Zephyranthes filifolia* Herb. ex Kraenzl.

Transcurrida una semana, se observó en el 95% de las semillas la protrusión de la radícula (Fig. 1 A). El porcentaje de germinación obtenido supera a los referidos por Rodrigo *et al.* (2006) en *Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub (*Amaryllidaceae*) y se aproximan a los informados en esta misma especie por Echeverría y Alonso (2010) y Maritano *et al.* (2011).

Dentro de los 15 días posteriores a la germinación fisiológica se observó la producción de hojas desde el meristemo apical y un ligero ensanchamiento de la base del brote conjuntamente con la formación de raíces (Fig. 1 B). Tal como lo describe Mujica *et al.* (2008) en ajo (*Allium sativum* L.) y Him y Paez (1998) en jengibre (*Zingiber officinale* R.), esta respuesta pudo estar dada por la acumulación de fotoasimilados y nutrientes en las hojas, lo cual favorece el crecimiento y llenado del bulbo y contribuye a su engrosamiento.

La transferencia de las semillas germinadas a medio de cultivo fresco a los 20 días, permitió el desarrollo de bulbillos en la base de las plantas y en la sección inferior del tallo (Fig. 1 C). Fuentevilla (2004), en cultivo *in vitro* de *Leucocoryne purpurea* (*Alliaceae*), arribó a resultados similares excepto que realizó la transferencia de las plántulas a un medio de cultivo de bulbificación, el cual contiene la misma base salina (MS) pero el doble de concentración de sacarosa (60 g l<sup>-1</sup>). Los carbohidratos son la principal fuente energética y estructural en los vegetales. Considerando que los órganos de almacenamiento, tales como cormos, rizomas o bulbos, permiten a las plantas resistir periodos desfavorables a través de la acumulación de agua y otros nutrientes, se puede asumir que el suministro de carbohidratos al medio de cultivo induce la formación del bulbo y su posterior desarrollo. En las raíces de algunas pocas plantas se observó la proliferación de tejido calloso (Fig. 1 D).

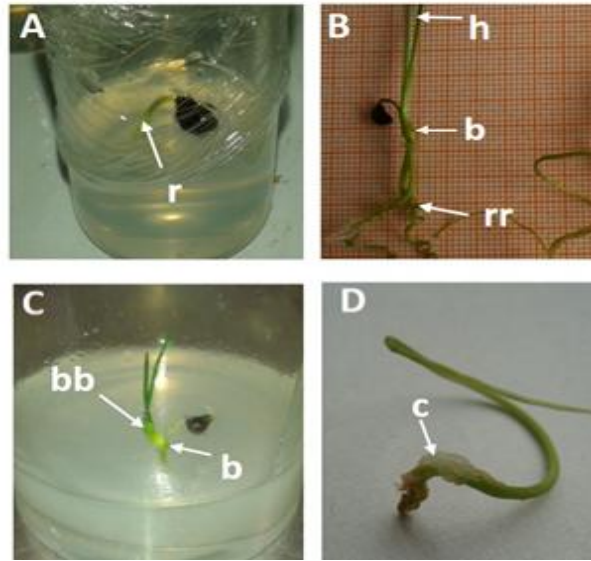


Figura 1. Desarrollo *in vitro* de *Zephyranthes* spp. a partir de semillas: A. Emergencia de la radícula (r) B. Plántula de un mes con hojas (h), bulbo (b) y raíces (rr) C. Bulbillos en la base de la planta (b) y en la parte inferior del tallo (bb) D. Formación de callos (c) en raíces de ejemplares de 3 meses de desarrollo.

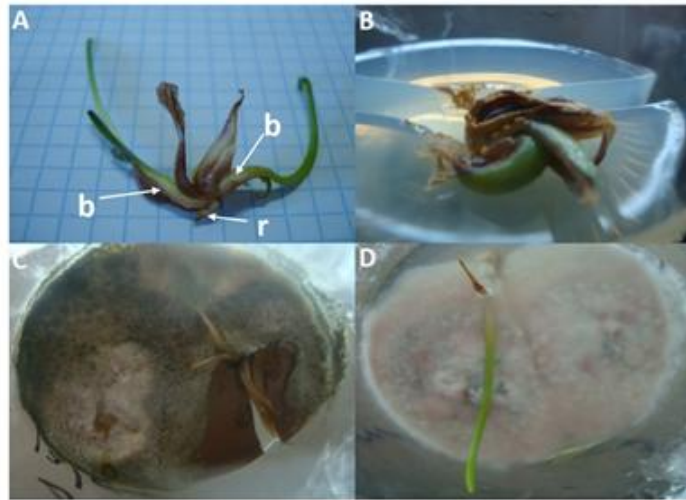


Figura 2. Explantes de *Zephyranthes* spp. establecidos *in vitro* a partir de secciones de bulbos. A, desarrollo de brotes (b) y raíces (r) B explante viable pero sin desarrollo. C y D, explantes contaminados por hongos filamentosos.

Las plantas obtenidas por este método pueden ser utilizadas como plantas madre para la posterior producción de explantes libres de contaminantes microbianos.

La desinfección de los bulbos con los distintos agentes desinfectantes no permitió eliminar la carga microbiana inicial presente en los explantes. Debido a esto, aunque se observó desarrollo de brotes, su establecimiento *in vitro* no fue exitoso.

A los 20 días de cultivo de las SB se observó el desarrollo de brotes en el 1% del total de los explantes (Fig. 2 A), lo cual representa una prueba del potencial organogénico. El 10% se mantuvo viable, pero sin desarrollo de brotes (Fig. 2 B).

El total de los explantes presentaron contaminación por microorganismos. Ningún método de desinfección fue efectivo para controlar la contaminación por hongos del

suelo (Fig. 2 C y D). En concordancia con estos resultados, Paredes *et al.* (2014) obtuvieron porcentajes elevados de contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de *Traubia modesta* (Amarillydaceae).

Teniendo en cuenta lo anterior, resulta necesario continuar los estudios para establecer un protocolo de desinfección eficaz para eliminar la contaminación fúngica en bulbos de *Zephyranthes* spp. De esta manera se podría emplear este tipo de material vegetal como explante inicial para el cultivo *in vitro* de la especie trabajada. En próximos trabajos pudiera incrementarse la concentración de hipoclorito de sodio según lo indicado por Navarro (2014) o utilizar bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno para la desinfección según lo propuesto por Castro y Londoño (2008).

## CONCLUSIONES

*Zephyranthes* spp. se estableció a partir de semillas y se observó el desarrollo de órganos tales como bulbos, raíces y hojas. Sin embargo, aunque se formaron órganos a partir de las secciones de bulbos, la contaminación microbiana afectó al 100% de los explantes.

## REFERENCIAS

Appezato Da Gloria B, Vieira M, Dornelas M (1999) Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced leaf-derived explant of passion fruit. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 34 (11): 2007-2013

Arulanandam John Peter L, Ghanthikumar S, Arunkumar T (2015) *In vitro* propagation of Rain Lily (*Zyphyranthes citrine* L.). Botanical Report 4(4): 5-7

Castro D, Londoño S (2008) Producción *in vitro* de microbulbos de lirio (*Lilium* sp.). Temas Agrarios 13(1): 5-13

Dahlgren R, Clifford H, Yeo P (1985) The Families of the Monocotyledons. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin; doi: 10.1007/978-3-642-61663-1

Dehdezi A A, Sadat Mousavi E, Azadi P (2014) Evaluation of different growth regulators on proliferation of *Polygonatum tuberosum*. Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences 3 (10): 172-174

Echeverría M L, Alonso S I (2010) Germinación y crecimiento inicial de *Habenaria gracilifolia* y *Rhodophiala bifida*, amarilidáceas nativas con

potencial ornamental. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias 42(1): 23-37

Fernández A, Curvetto N, Marinangeli P (2008) Establecimiento *in vitro* de *Zephyranthes filifolia*. En: INTA (ed) 4° Congreso Argentino de Floricultura y plantas ornamentales, Corrientes, 4-7/11/2008, pp. 00-00, INTA, Argentina

Fuentevilla Saa C C (2004) Propagación *in vitro* de algunas especies de *Leucocoryne*. Tesis de ingeniero agrónomo. Universidad Católica de Valparaíso, Quillota, Chile

Gangopadhyay M, Chakraborty D, Dewanjee S, Bhattacharya S (2010) Clonal propagation of *Zephyranthes grandiflora* using bulbos as explants. Biologia Plantarum 54 (4): 793-797; doi: 10.1007/s10535-010-0145-5

Han B, Suh E, Choi S, Yae B, Yu H, Goo D (2004) Stimulation of *in vitro* bulblet growth by the addition of liquid medium in *Lilium oriental* hybrid Casablanca. Journal of Plant Biotechnology 6 (4): 241-246

Him D, Paez de Cáceres J (1998) Origen histológico de los órganos regenerados *in vitro* de jengibre (*Zingiber officinale* R.) Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture 42: 110-118

Kamo K, Rajasekaran K, Cary J (2014) Growth characteristics of micropropagated, regenerated and transgenic *Gladiolus* plants. Journal of Applied Horticulture 16(3): 193-198

Kizil S, Khawar KM (2014) The effects of plant growth regulators and incubation temperatures on germination and bulb formation of *Fritillaria persica* L. propagation of ornamental plants 14(3): 133-138

López HA (1995) Manual de prácticas de laboratorio de producción y tecnología de semillas. Fitotecnia, UACH, Chapingo México

Malik M, Bach A (2016). Morphogenetic pathways from Narcissus L. 'Carlton' *in vitro* cultures of Pc stage flower bud explants according to cytokinin and auxin ratios. Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus 15(1): 101-111

Maritano P, Gonzalez Rocca L, Irigoyen E, Marinangeli P, Escandón A (2011) Avances para la micropropagación de una geófita nativa con potencial ornamental: *Rhodophiala bifida*. En: REDBIO Argentina (ed) VIII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO, Buenos Aires, 13-15/11/2011, pp. 00-00, REDBIO Argentina, Buenos Aires

Meerow A, Snijman D (1998) *Amaryllidaceae*. En: Kubitzki K (ed) Flowering Plants · Monocotyledons,

pp. 83-110. Springer -Verlag, Berlin; doi: 10.1007/978-3-662-03533-7\_11

Meerow A, Snijman D (2001) Phylogeny of *Amaryllidaceae* tribe *Amaryllidaceae* based on nrDNA ITS sequences and morphology. *American Journal of Botany* 88 (12): 2321-2330

Mujib A, Banerjee S, Maqsood M, Ghosh P D (2014) Organogenesis and plant regeneration in *Zephyranthes rosea* Lindl.: Histological and chromosomal study. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 148(3): 492-498; doi: 10.1080/11263504.2013.788097

Mujica H, Sanabria M, Mogollon N, Perez Y (2008) Formación *in vitro* de bulbo de ajo morado (*Allium sativum* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía LUZ* 25 (2): 197-210

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497

Navarro P (2014) Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales de plantas del género *Zephyranthes* y evaluación de su producción de alcaloides. Trabajo de grado para optar al pregrado de Química Farmacéutica, Universidad ICESI Facultad de Ciencias Naturales Químicas Farmacéuticas y Universidad de Cali, Cali, Colombia

Paredes K, Delaveau C, Carrasco P, Baeza C, Mora F, Uribe M (2014) *In vitro* bulbing for the propagation of *Traubia modesta* (*Amaryllidaceae*), a threatened plant endemic to Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* 41(2): 207-214

Passos I, Bernacchi L (2005) Cultura de tesidos aplicada a manutenção de germoplasma *in vitro* e

ao melhoramento genético de maracujá (*Passiflora* spp.) En: Faleiro F, Junqueira N, Braga M (eds) *Maracujá: germoplasma e molhoramento genético*, pp. 361-383. Embrapa Cerrados, Planaltina DF; ISBN: 85-7075-029-3

Roca W, Mroginsky L (1991) Cultivo de tejidos en agricultura, fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de la Agricultura Tropical (CIAT), Cali; ISBN: 9589183158

Rodrigo J M, Rosselló F J, Marinangeli P A, Curvetto N R (2006) Germinación *in vitro* de *Rhodophiala bifida*. En: INTA (ed) *Actas del III Congreso Argentino de Floricultura y IIX Jornadas Nacionales de Floricultura*, Buenos Aires, 07-10/11/2006, pp. 428-430. INTA, Buenos Aires

Shivakumar G, Krishnamurthy K (2004) *In vitro* organogenetic responses of *Gloriosa superba* Russ. *Journal of Plant Physiology* 51 (5): 713-721; doi: 10.1023/B:RUPP.0000040761.45363.75

Smith R H, Burrows J, Kurten K (1999) Challenges associated with micropropagation of *Zephyranthes* and *Hippeastrum* sp. (*Amaryllidaceae*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 35(4): 281-282; doi: 10.1007/s11627-999-0032-y

Zhang W, Song L, da Silva J A T, Sun H (2013) Effects of temperature, plant growth regulators and substrates and changes in carbohydrate content during bulblet formation by twin scale propagation in *Hippeastrum vittatum* 'Red lion'. *Scientia Horticulturae* 160: 230-237; doi: 10.1016/j.scienta.2013.06.001

Recibido: 16-11-2016

Aceptado: 25-'1-2017