

CULTIVO *IN VITRO* DE TEJIDOS VEGETALES DE PLANTAS DE LA FAMILIA
AMARYLLIDACEAE

JORGE EMILIO REYES MORENO

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2014

CULTIVO *IN VITRO* DE TEJIDOS VEGETALES DE PLANTAS DE LA FAMILIA
AMARYLLIDACEAE

JORGE EMILIO REYES MORENO

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE PREGRADO EN
QUÍMICA FARMACÉUTICA

TUTOR: MARCELA SANTAELLA TENORIO, PhD
COTUTOR: ZAIDA JOSEFINA LENTINI GIL, PhD

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2014



APROBADO POR:

Eddie Tabares

(Nombre Correspondiente)
Evaluador Externo.

Roosevelt Escobar

(Nombre Correspondiente)
Evaluador Externo.

Marcela Santaello T., Ph.D.

(Nombre Correspondiente)
Director del Proyecto.

Zaida Lentini, Ph.D.

(Nombre Correspondiente)
Director ó Co-Director del Proyecto.

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Icesi, por brindarme los conocimientos y la oportunidad de prepararme integralmente para ejercer de manera satisfactoria mi profesión en el futuro.
- A mi familia por brindarme su apoyo durante todos estos años de formación académica.
- A mi directora del trabajo de grado, Marcela Santaella Tenorio, y co-directora del trabajo de grado, Zaida Lentini Gil, por su generosa colaboración y orientación.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	5
3. MARCO TEÓRICO.....	6
3.1 FAMILIA <i>AMARYLLIDACEAE</i>	6
3.2 BANCOS DE GERMOPLASMA	8
3.3 CULTIVO <i>IN VITRO</i>	8
3.4 REGULADORES DE CRECIMIENTO	10
3.5 MEDIOS DE CULTIVO	11
3.6 DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	12
4. OBJETIVOS.....	15
4.1 OBJETIVO GENERAL	15
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
5. METODOLOGÍA	16
5.1 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE EVALUADA	16
5.2 DESCRIPCIÓN DE LOS CULTIVOS.....	16
5.3 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA ANALIZADA	17
5.4 LUGAR DE DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN.....	17
5.5 METODOLOGÍA EMPLEADA	17
5.6 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE LOS EXPLANTES.....	19
5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
5.8 MATRIZ DE MARCO LÓGICO	20
6. RESULTADOS.....	22
6.1 DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	22
6.2 EXPLANTES QUE RESPONDIERON A LOS TRATAMIENTOS.....	23
6.2.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.....	25
6.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
7. DISCUSIÓN	32
7.1 DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	32
7.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.....	32

7.3 NÚMERO DE EXPLANTES QUE RESPONDIERON	33
8. CONCLUSIONES	36
9. RECOMENDACIONES	37
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
11. ANEXOS	40
11.1 EVIDENCIA FOTOGRÁFICA	40

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. TRATAMIENTOS EMPLEADOS.....	17
Tabla 2. MATRIZ DE MARCO LÓGICO.....	20
Tabla 3. PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN.....	22
Tabla 4. RESPUESTA GENERAL DE LAS 8 REPETICIONES	25
Tabla 5. LONGITUD DE LA HOJA MÁS LARGA POR BULBILLO	26
Tabla 6. DIÁMETRO DE LOS BULBILLOS.....	29
Tabla 7. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) RESPECTO AL NÚMERO DE EXPLANTES QUE RESPONDIERON POR CADA TRATAMIENTO	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tratamiento 8 repetición 7 (58 días de cultivo)	23
Figura 2. Tratamiento 10 repetición 4 (64 días de cultivo)	23
Figura 3. Tratamiento 7 repetición 6 (58 días de cultivo)	24
Figura 4. Tratamiento 7 repetición 6 (58 días de cultivo)	24
Figura 5. Tratamiento 2 repetición 2 (62 días de cultivo)	25
Figura 6. Tratamiento 3 repetición 6 (58 días de cultivo)	27
Figura 7. Tratamiento 1 repetición 5 (83 días de cultivo)	27
Figura 8. Tratamiento 8 repetición 5 (66 días de cultivo)	28
Figura 9. Tratamiento 8 repetición 5 (87 días de cultivo)	28
Figura 10. Tratamiento 2 repetición 4 (107 días de cultivo)	29

RESUMEN

La familia de plantas Amaryllidaceae tiene amplio interés farmacéutico debido a su contenido de alcaloides con distintas actividades terapéuticas. De los alcaloides encontrados en esta familia destaca principalmente la galantamina, el cual es empleado para el tratamiento paliativo de la enfermedad de Alzheimer.

En Colombia, particularmente en el Valle del Cauca, algunas de las especies pertenecientes a esta familia se encuentran amenazadas debido a la destrucción de su hábitat. Por ello resulta importante desarrollar metodologías que permitan preservar estas especies, mediante estrategias como el establecimiento de bancos de germoplasma *ex situ*.

El establecimiento de este banco de germoplasma se puede lograr de una manera controlada, mediante técnicas de cultivo *in vitro* como la propagación clonal de plantas, también llamada micropropagación. Esta técnica permite obtener plantas genéticamente idénticas (clones) a partir de una sola planta, usando pequeños fragmentos de la misma (explantes) aprovechando la capacidad regenerativa del tejido vegetal.

En consecuencia, este proyecto busca proveer información crítica que contribuya al establecimiento de un banco de germoplasma *ex situ*, mediante la estandarización de un protocolo de cultivo *in vitro* para una especie local (*Zephyranthes carinata*) de la familia Amaryllidaceae en Colombia. El proyecto además evalúa el crecimiento y desarrollo de esta especie respecto al uso de 2 reguladores de crecimiento (BAP y ANA) a diferentes concentraciones, usando un medio de cultivo preestablecido.

En el trabajo se investigaron cinco siembras en las que se presentaron porcentajes de contaminación de 47%, 10%, 0%, 0% y 10%. Adicionalmente se encontró que en la concentración de 0.5 mg/L de BAP respondieron un mayor número de explantes con bulbillos respecto a los otros tratamientos a los 55 días y se obtuvieron los bulbillos con diámetros de mayor tamaño. También se encontró que en las concentraciones de 1 mg/L de BAP junto con 0.25 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP junto con 0.25 mg/L de ANA no se desarrollaron bulbillos. Sin embargo el análisis de varianza reveló que no había diferencia significativa entre los diferentes tratamientos empleados. Por lo tanto se concluyó que bajo las condiciones experimentales de la investigación no se encontraron diferencias significativas entre la respuesta a los reguladores de crecimiento y el control.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, Amaryllidaceae, *Zephyranthes*, *twin scaling*, bencilaminopurina, ácido naftalenacético.

ABSTRACT

The plants family Amaryllidaceae has broad pharmaceutical interest due to its content of alkaloids with different therapeutic activities. From the alkaloids found in this family mainly stands galantamine, which is used for the palliative treatment of Alzheimer's disease.

In Colombia, particularly in the Valle del Cauca, some of the species belonging to this family are threatened due to habitat destruction. It is therefore important to develop methodologies to preserve these species, using strategies such as the establishment of *ex situ* germplasm banks.

The establishment of this germplasm bank can be achieved in a controlled manner, using *in vitro* culture techniques such as clonal propagation of plants, also called micropropagation. This technique allows to obtain genetically identical plants (clones) from a single plant, using small plant fragments (explants) taking advantage of the regenerative capacity of the plant tissue.

Consequently, this project seeks to provide critical information that contributes to the establishment of an *ex situ* germplasm bank, by standardizing a protocol for *in vitro* culture for local species (*Zephyranthes carinata*) of the Amaryllidaceae family in Colombia. The project also evaluates the growth and development of this species using two growth regulators (BAP and NAA) at different concentrations, using a preset culture medium.

In this work five sowings were researched where contamination percentage of 47%, 10%, 0%, 0% and 10%, respectively, occurred. Additionally it was found that at the concentration of 0.5 mg/L of BAP explants responded with more bulblets than the other treatments at 55 days and the bulblets were obtained with larger diameters. It was also found that at the concentrations of 1 mg/L of BAP with 0.25 mg/L of NAA and at 2 mg/L of BAP with 0.25 mg/L of NAA no bulblets developed. However, the analysis of variance revealed no significant difference between the different treatments applied. Therefore it was concluded that under the experimental conditions of the investigation no significant difference between the response to growth regulators and control were found.

Keywords: *in vitro* culture, Amaryllidaceae, *Zephyranthes*, twin scaling, benzylaminopurine, naphthaleneacetic acid.

1. INTRODUCCIÓN

La familia de plantas Amaryllidaceae se caracteriza por plantas con bulbo subterráneo, sin tallo aéreo verdadero, con flores bisexuales generalmente grandes y vistosas (Silverstone-Sopkin, 2011). Son de amplio interés farmacéutico debido a su contenido de alcaloides con actividades terapéuticas empleados en el tratamiento de diversas enfermedades como la enfermedad de Alzheimer, cáncer y la malaria (de Andrade *et al*, 2011; Peng *et al*, 2014; Bin *et al*, 2013). Entre los alcaloides más destacados se encuentra la galantamina, el cual es empleado para el tratamiento paliativo de la enfermedad de Alzheimer (de Andrade *et al*, 2011), y la licorina, debido a que sus derivados presentan actividad anticancerígena y antipalúdica (Peng *et al*, 2014; Bin *et al*, 2013).

En esta familia de plantas al menos 10 especies nativas de la región del Valle del Cauca de los géneros *Calicharis*, *Caliphruria*, *Eucharis*, *Hippeastrum*, *Phaedranassa* y *Plagiolirion* se encuentran amenazadas por la destrucción de su hábitat (Silverstone-Sopkin, 2011).

Debido a la amenaza en la que se encuentran algunas especies de esta familia y dado su potencial uso en el desarrollo de productos farmacéuticos, se deben buscar formas de conservar y multiplicar especies nativas de la diversidad regional y nacional. Lo anterior se puede lograr mediante el establecimiento de bancos de germoplasma *ex situ*, lo cual puede incluir metodologías de cultivo *in vitro* (Sánchez-Chiang & Jiménez, 2010).

Los bancos de germoplasma *in vitro* son sitios para la conservación de los recursos genéticos, estos involucran diversas técnicas de cultivo y almacenamiento *in vitro*. Se encuentran bajo condiciones controladas y se usan con el propósito de maximizar la diversidad de ejemplares recolectados de poblaciones en campo o en su centro de origen. La unidad de colección empleada puede ser la semilla o explantes.

El cultivo *in vitro* de diferentes especies pertenecientes a esta familia ha sido estudiado ampliamente a nivel mundial (Mirici *et al*; 2005; Nasircilar, 2010; Selles *et al*, 1999; Ptak *et al*, 2009; El Tachy *et al*, 2010; Ptak *et al*, 2010; Yuliyana *et al*, 2009; Hol & Linde, 1992; Kohut *et al*, 2007; Ulrich *et al*, 1999; Zayed *et al*, 2011; Rice *et al*, 2011), sin embargo las especies evaluadas en estos estudios no se encuentran naturalmente en Colombia.

El cultivo de tejido vegetal de especies de la familia Amaryllidaceae frecuentemente se desarrolla mediante la obtención de explantes del bulbo con la técnica de *twin-scaling* (Yuliyana *et al*, 2009; Hol & Linde, 1992; Mirici *et al*, 2005; Nasircilar *et al*, 2010; Zayed *et al*, 2011; Rice *et al*, 2011), la cual consiste en seccionar el bulbo de tal forma que se obtengan dos escamas unidas a una

porción de placa basal, lográndose obtener de este modo una gran cantidad de explantes por bulbo, aproximadamente 50. Los explantes obtenidos mediante esta técnica requieren de altos niveles de asepsia, haciéndose necesaria la esterilización del material de trabajo y la desinfección de los explantes obtenidos (Bach & Sochacki, 2012).

El presente proyecto tuvo como objetivo establecer un método de desinfección, utilizar diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas para obtener bulbillos a partir de un determinado número de explantes y comparar los resultados obtenidos con los reportados en la literatura.

2. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Dado el contenido de alcaloides con actividades terapéuticas como: propiedades inhibitorias de la acetilcolinesterasa, citotóxicas, antivirales, entre otras. La familia Amaryllidaceae se convierte en una de las familias de plantas que despierta gran interés en el campo farmacéutico. Entre los alcaloides que se encuentran en esta familia destaca principalmente la galantamina, el cual es empleado para el tratamiento paliativo de la enfermedad de Alzheimer y se encuentra ampliamente estudiado. Adicionalmente son plantas con un amplio uso ornamental debido a sus flores grandes y vistosas.

En Colombia, particularmente en el Valle del Cauca existen o existían 6 géneros de esta familia: *Calicharis*, *Caliphruria*, *Eucharis*, *Hippeastrum*, *Phaedranassa* y *Plagiolirion*, de las cuales al menos 10 especies nativas se encuentran amenazadas debido a la destrucción de su hábitat (Silverstone-Sopkin, 2011).

Debido a la amenaza en la que se encuentran algunas especies de esta familia y dado su potencial uso en el desarrollo de productos farmacéuticos, se deben buscar formas de conservar y multiplicar especies nativas de la diversidad regional y nacional.

El establecimiento de bancos de germoplasma *ex situ* es una buena estrategia para contribuir a la conservación y multiplicación de las especies amenazadas, la cual puede apoyarse de técnicas de multiplicación *in vitro*. Sin embargo la investigación colombiana entorno al desarrollo de metodologías de cultivo *in vitro* de especies nativas de esta familia es escasa.

Por esto, con el fin de proveer información de base para el establecimiento de un banco de germoplasma de especies amenazadas de la familia Amaryllidaceae, el proyecto evaluó el desarrollo en cultivo *in vitro* de una especie no amenazada de esta familia, *Zephyranthes carinata*, en diferentes concentraciones de dos reguladores de crecimiento. De esta manera se espera contribuir al desarrollo de protocolos de micropropagación de especies amenazadas de la familia Amaryllidaceae para su uso en el establecimiento de bancos de germoplasma.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 FAMILIA AMARYLLIDACEAE

Las amarilidáceas son hierbas terrestres, no trepadoras, generalmente no epífitas, con bulbo subterráneo, sin tallo aéreo verdadero, con hojas inermes y no equitantes, con flores bisexuales generalmente grandes y vistosas, con tépalos unidos en la base formando un tubo, y fruto en cápsula (Silverstone-Sopkin, 2011).

Son empleadas ornamentalmente y tienen una amplia aplicación farmacéutica debido a la presencia de metabolitos secundarios, particularmente alcaloides, con actividad farmacológica, razón por la cual son empleados para el tratamiento de diversas enfermedades como: la enfermedad de Alzheimer, cáncer y la malaria (de Andrade *et al*, 2011; Peng *et al*, 2014; Bin *et al*, 2013). Uno de los alcaloides más destacados es la galantamina, un inhibidor de la acetilcolinesterasa empleado para el tratamiento paliativo de la enfermedad de Alzheimer (de Andrade *et al*, 2011).

A nivel nacional, al menos 10 especies nativas de la región del Valle del Cauca de los géneros *Calicharis*, *Caliphruria*, *Eucharis*, *Hippeastrum*, *Phaedranassa* y *Plagiolirion* se encuentran amenazadas por la destrucción de su hábitat (Silverstone-Sopkin, 2011). Por lo tanto se deben buscar metodologías que permitan preservar estas especies dada su importancia como plantas ornamentales y su potencial aplicación farmacéutica. Una buena estrategia es el establecimiento de bancos de germoplasma *ex situ*, lo cual puede incluir metodologías de cultivo *in vitro*.

A nivel mundial se encuentran estudios que proveen información relacionada sobre el cultivo *in vitro* de diferentes especies de la familia Amaryllidaceae (Mirici *et al*; 2005; Nasircilar, 2010; Selles *et al*, 1999; Ptak *et al*, 2009; El Tachy *et al*, 2010; Ptak *et al*, 2010; Yuliyana *et al*, 2009; Hol & Linde, 1992; Kohut *et al*, 2007; Ulrich *et al*, 1999; Zayed *et al*, 2011; Rice *et al*, 2011), sin embargo las especies evaluadas en estos estudios no son especies que se encuentren naturalmente en Colombia. Por otro lado, los estudios en Colombia son escasos y se enfocan más en la evaluación de sus alcaloides que en el cultivo *in vitro* (Niño *et al*, 2005). Por esto el proyecto contribuye al conocimiento sobre esta área, con una especie local (*Zephyranthes carinata*), para que de esta manera se aporte al desarrollo de protocolos de cultivo *in vitro* de especies de esta familia en el país.

Las especies de amarilidáceas que han sido trabajadas en cultivo *in vitro* son de los géneros *Leucojum* (Yuliyana *et al*, 2009; Kohut *et al*, 2007; Ptak *et al*, 2009; El Tachy *et al*, 2010), *Narcissus* (Hol & Linde, 1992; Selles *et al*, 1999), *Sternbergia* (Mirici *et al*, 2010), *Muscari* (Nasircilar *et al*, 2010), *Crinum* (Ulrich *et al*, 1999; Niño

et al, 2005), *Hippeastrum* (Zayed *et al*, 2011; Vargas *et al*, 2006) y *Brunsvigia* (Rice *et al*, 2011). La propagación de estas especies se ha realizado con explantes obtenidos a partir de diferentes órganos de la planta. Entre los órganos usados se encuentran semillas (Mirici *et al*, 2005; Nasircilar, 2010; Selles *et al*, 1999), hojas (Nasircilar *et al*, 2010; Ptak *et al*, 2009; El Tachy *et al*, 2010; Ptak *et al*, 2010) y bulbos (Yuliyana *et al*, 2009; Hol & Linde, 1992; Kohut *et al*, 2007; Mirici *et al*, 2005; Nasircilar *et al*, 2010; Ulrich *et al*, 1999; Zayed *et al*, 2011; Niño *et al*, 2005; Rice *et al*, 2011; Vargas *et al*, 2006).

Existen diversas técnicas empleadas para la micropropagación de plantas geófitas. La primera de ellas es “*scaling*”, la segunda es “*Cross-cutting*” y “*Scooping*”, la tercera es “*Chipping*” y “*twin-scaling*” y la cuarta es “*Cuttings*” (Bach & Sochacki, 2012). La técnica de *scaling* se basa en la habilidad que tienen las escamas retiradas del bulbo para producir una nueva planta. Las técnicas de *cross-cutting* y *scooping* se basan en la destrucción de la dominancia apical del bulbo y la inducción de la formación de bulbillos en la superficie herida de la placa basal. La técnica *cuttings* aprovecha la capacidad que tienen algunas plantas geófitas para regenerar plántulas a partir de segmentos de hoja. La técnica de *chipping* consiste en el seccionamiento del bulbo mediante cortes verticales, se pueden cortar 4, 8 ó 16 secciones iguales y cada porción debe tener una parte de la placa basal (Bach & Sochacki, 2012).

De las técnicas anteriores la más antigua, la más estudiada y la más usada es la técnica de *twin-scaling* (Yuliyana *et al*, 2009; Hol & Linde, 1992; Mirici *et al*, 2005; Nasircilar *et al*, 2010; Zayed *et al*, 2011; Rice *et al*, 2011; Bach & Sochacki, 2012), la cual consiste en seccionar el bulbo de tal forma que se obtengan dos escamas unidas a una porción de placa basal, lográndose obtener de este modo una gran cantidad de explantes por bulbo, generando de 20 a 45 bulbillos aproximadamente (Bach & Sochacki, 2012). Sin embargo a pesar de ser una técnica sencilla los explantes obtenidos son pequeños y delicados, por lo cual se deben proteger de la desecación y la contaminación (Bach & Sochacki, 2012). Por lo anterior los explantes obtenidos mediante esta técnica requieren de altos niveles de asepsia, haciéndose necesaria la esterilización del material de trabajo y la desinfección de los explantes obtenidos (Bach & Sochacki, 2012).

Además de las técnicas anteriormente descritas también se ha encontrado variaciones de la técnica de *twin-scaling*. En estas variaciones los explantes se encontraban formados por 3 ó 4 escamas de los bulbos en lugar de 2 (Mirici *et al*, 2005; Nasircilar *et al*, 2010; Ulrich *et al*, 1999; Zayed *et al*, 2011).

3.2 BANCOS DE GERMOPLASMA

Los bancos de germoplasma *in vitro* son sitios para la conservación de los recursos genéticos en condiciones controladas de laboratorio y que involucran diversas técnicas de cultivo y almacenamiento *in vitro*. En estos se busca maximizar la diversidad de ejemplares recolectados de poblaciones en campo o en su centro de origen. La unidad de colección que se mantiene en condiciones controladas puede ser la semilla o explantes (Sánchez-Chiang & Jiménez, 2010).

La conservación *in vitro* constituye parte esencial de la estrategia general para la conservación y el intercambio de recursos fitogenéticos a nivel mundial. Esta ofrece la posibilidad de almacenar un elevado número y variedad de muestras en un área reducida y facilita el acceso a ellas para su evaluación. Las condiciones asépticas empleadas garantizan una mayor sanidad de las muestras, lo que permite incrementar el intercambio de materiales vegetales sanos. Sin embargo, para establecer cualquier estrategia de conservación *in vitro*, se hace indispensable el dominio de una metodología de propagación que garantice altos porcentajes de supervivencia. El principal objetivo de los bancos de germoplasma *in vitro* es conservar las especies que presentan semillas de corta y poca viabilidad, cultivos de propagación clonal, o que son altamente heterocigóticos y requieren ser propagados vegetativamente para conservar su integridad genética (García-Águila *et al*, 2007).

3.3 CULTIVO IN VITRO

La propagación clonal de plantas mediante cultivo *in vitro* es llamada micropropagación. En esta se aprovecha de la habilidad natural que poseen las plantas para regenerarse, ya sea por embriogénesis u organogénesis. Mediante micropropagación se obtienen plantas genéticamente idénticas (clones) a partir de un fragmento (explante) de una planta madre. La micropropagación está conformada por varias etapas: una etapa 0 de selección y preparación de la planta madre, seguida de la etapa I de iniciación y establecimiento de condiciones asépticas, luego una etapa II de multiplicación de brotes o rápida formación de embriones somáticos mediante un medio de cultivo, a continuación una etapa III de enraizamiento y finalmente una etapa IV de aclimatación (M. K. Razdan, 2003; Roca & Mroginski, 1991).

En la etapa cero las plantas madre son mantenidas por al menos 3 meses en condiciones controladas en un invernadero, donde se mantienen en una humedad relativa baja y se adoptan medidas para reducir contaminantes microbiológicos (M. K. Razdan, 2003; Roca & Mroginski, 1991).

En la etapa I se preparan los explantes obtenidos a partir de la planta madre de la etapa cero, mediante la desinfección de los mismos y su posterior establecimiento en un medio de cultivo apropiado (M. K. Razdan, 2003; Roca & Mroginski, 1991).

En la etapa II se usa un medio de cultivo definido que estimule la máxima proliferación de los brotes regenerados, esta etapa ocupa la mayor parte de la micropropagación y puede llevarse a cabo a partir de 3 enfoques: multiplicación por crecimiento y proliferación de meristemos extirpados de brotes apicales y axilares de la planta madre, inducción y multiplicación de meristemos adventicios a través de procesos de organogénesis o embriogénesis somática directamente en los explantes y multiplicación de callos derivados de órganos, tejidos o células y su subsecuente expresión de organogénesis o embriogénesis somática (M. K. Razdan, 2003; Roca & Mroginski, 1991).

En la etapa III los brotes multiplicados durante la etapa II son transferidos a un medio de enraizamiento donde se estimula el desarrollo de raíces. Finalmente, en la etapa IV se asegura la transferencia exitosa de las plántulas obtenidas en la etapa anterior, desde el ambiente aséptico del laboratorio al ambiente del invernadero (M. K. Razdan, 2003; Roca & Mroginski, 1991).

Actualmente la micropropagación tiene múltiples aplicaciones, como por ejemplo: Propagación masiva de plantas difíciles de propagar por otros métodos o en vía de extinción, clonación de individuos de características deseadas, obtención de plantas libres de virus, producción de semillas sintéticas, conservación de germoplasma, obtención de metabolitos secundarios, producción de nuevos híbridos, mejora genética de plantas, germinación de semillas y estudios fisiológicos (M. K. Razdan, 2003; Roca & Mroginski, 1991).

Como se mencionó anteriormente esta técnica aprovecha la capacidad natural de las plantas para regenerarse. Esto se debe a que las células vegetales, específicamente las células de los meristemos, son totipotenciales, es decir que tienen la capacidad de permitir el desarrollo de un nuevo individuo sin necesidad de reproducirse sexualmente. Adicionalmente las células vegetales, a diferencia de las animales, tienen la capacidad de desdiferenciarse y posteriormente rediferenciarse en órganos o plantas nuevas. Esta característica se va perdiendo con el grado de diferenciación de las células, sin embargo la diferenciación puede ser revertida con determinadas condiciones de cultivo, como el tipo de regulador de crecimiento empleado (M. K. Razdan, 2003; Bach & Sochacki, 2012).

Los medios de cultivo usados en micropropagación deben contener todos los nutrientes necesarios para que la planta sobreviva. Generalmente el medio de cultivo se encuentra compuesto de sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, una fuente de carbono, agua y un agente gelificante. La composición de sales minerales básicas que necesitan las plantas fue propuesta por Murashige y Skoog en 1962 y es conocida universalmente como el medio MS. La fuente de

carbono habitualmente empleada es la sacarosa, esta regula diferentes procesos en la planta como la tuberización, la regeneración de raíces adventicias y la maduración de embriones somáticos. El estado de solidificación del medio se regula mediante el uso de un agente gelificante, es importante regular este estado porque afecta la intensidad del intercambio gaseoso entre el explante y el medio ambiente, así como la disponibilidad del agua y los iones presentes en el medio, además proporciona el soporte para el posicionamiento del explante. Adicionalmente se debe tener un control sobre el pH, el cual debe ajustarse entre 5.5 y 6.0, pues es el pH óptimo para el crecimiento de la mayoría de las plantas (Bach & Sochacki, 2012).

La respuesta de las células vegetales al medio puede ser de dos tipos: mediante organogénesis directa u organogénesis indirecta. La organogénesis directa consiste en la formación directa de los órganos, mientras que la organogénesis indirecta consiste en la formación de un callo, el cual es un conjunto de células indiferenciadas, que posteriormente puede generar órganos (Bach & Sochacki, 2012).

Los resultados obtenidos por medio de micropropagación están influenciados por muchos factores, como las condiciones ambientales, el genotipo, el tipo de explante y los medios de cultivo. Por ello se debe tener un control de las condiciones ambientales como la luz y la temperatura (Bach & Sochacki, 2012).

3.4 REGULADORES DE CRECIMIENTO

Los reguladores de crecimiento en plantas incrementan el número potencial de órganos regenerados. Entre los reguladores de crecimiento se encuentran las hormonas de las plantas y sus análogos sintéticos. En general los reguladores se clasifican en seis grupos: citoquininas, auxinas, giberelinas, retardantes del crecimiento, ácido abscísico y etileno. Las citoquininas son derivados de purinas o urea y estimulan la división celular, las más conocidas son: bencilaminopurina (BAP), kinetina (KIN), zeatina (ZEA), isopenteniladenina (2iP) y tidiazurón (TDZ). Las auxinas también regulan la división celular y adicionalmente el crecimiento, se emplean frecuentemente los análogos sintéticos del ácido indol acético debido a que este es degradado fácilmente por la luz, los análogos más conocidos son: ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Bach & Sochacki, 2012).

Los resultados obtenidos con el uso de auxinas y citoquininas exógenas en el cultivo *in vitro* son variados, pues diferentes proporciones de las mismas pueden estimular o inhibir el desarrollo de los explantes, lo cual también se ve influenciado según el tipo de explante, su origen y el tipo de fitohormona (Bach & Sochacki, 2012).

Los reguladores de crecimiento más empleados en el cultivo *in vitro* de amarilidáceas son: bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA), sin embargo también se han empleado otros reguladores como el picloram (Ptak *et al*, 2010) y tidiazurón (Mirici *et al*, 2005; Nasircilar *et al*, 2010). Se ha encontrado que ANA tiene efectos inhibitorios (Ulrich *et al*, 1999; Rice *et al*, 2011) y que por lo tanto debe ser usado en combinación con BAP (Rice *et al*, 2011), manteniendo una menor proporción de ANA. Lo anterior se ha evidenciado en diversos estudios, pues generalmente el ANA está en menor proporción que el BAP (Yuliyana *et al*, 2009; Hol & Linde, 1992; Kohut *et al*, 2007; Mirici *et al*, 2005; Nasircilar *et al*, 2010; Ulrich *et al*, 1999; Vargas *et al*, 2006) y los resultados que se observan verifican que se obtiene mejor desarrollo en bajas proporciones de ANA (Mirici *et al*, 2005; Nasircilar *et al*, 2010).

En el grupo de investigación en biotecnología y química de la Universidad Icesi (GIByQ) se han obtenido buenos resultados con la micropropagación de *Eucharis x grandiflora* usando la técnica de *twin-scaling*, aun sin hacer uso de reguladores de crecimiento. Por esto se esperó obtener resultados similares o mejores empleando la misma metodología con *Zephyranthes carinata*, pero evaluando dos reguladores de crecimiento: bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA). Los reguladores de crecimiento empleados y sus concentraciones fueron seleccionados con base en los resultados de la literatura, mencionados anteriormente.

3.5 MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo habitualmente empleados en el cultivo *in vitro* de tejido vegetal de la familia Amaryllidaceae contienen una concentración de 3 % (30 g/L) de sacarosa (Mirici *et al*; 2005; Nasircilar, 2010; Selles *et al*, 1999; Ptak *et al*, 2009; El Tachy *et al*, 2010; Ptak *et al*, 2010; Yuliyana *et al*, 2009; Hol & Linde, 1992; Kohut *et al*, 2007; Ulrich *et al*, 1999; Zayed *et al*, 2011; Rice *et al*, 2011; Vargas *et al*, 2006), concentraciones variables de agar que van desde 6 g/L hasta 8 g/L o una concentración de gelrite de 0.3% (Mirici *et al*; 2005; Nasircilar, 2010; Selles *et al*, 1999; Ptak *et al*, 2009; El Tachy *et al*, 2010; Ptak *et al*, 2010; Yuliyana *et al*, 2009; Hol & Linde, 1992; Kohut *et al*, 2007; Ulrich *et al*, 1999; Zayed *et al*, 2011; Rice *et al*, 2011; Vargas *et al*, 2006) y una concentración de MS de 4.4 g/L. Adicionalmente el pH de los medios se ajusta entre 5.5 y 6.0 (Mirici *et al*; 2005; Nasircilar, 2010; Selles *et al*, 1999; Ptak *et al*, 2009; El Tachy *et al*, 2010; Ptak *et al*, 2010; Yuliyana *et al*, 2009; Hol & Linde, 1992; Kohut *et al*, 2007; Zayed *et al*, 2011), siendo más habitual los ajustes a pH 5.5 y 5.7.

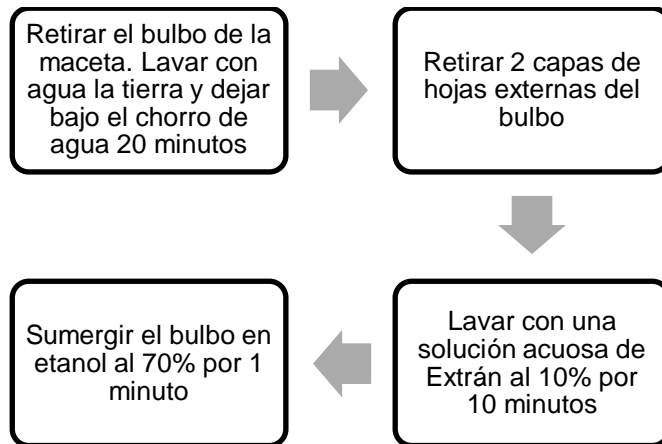
Además del pH y la concentración de los componentes del medio también se debe tener en cuenta otras condiciones como la temperatura y el fotoperíodo. Varios autores utilizan una temperatura de 25 °C (Nasircilar, 2010; Selles *et al*, 1999;

Ulrich *et al*, 1999; Rice *et al*, 2011), mientras que otros utilizan temperaturas de 24 °C (Mirici *et al*, 2005), 23 °C (Yuliyana *et al*, 2009), 15 °C (Hol & Linde, 1992) y 26 °C (Smith *et al*, 1999). En cuanto al fotoperiodo se suele emplear periodos prolongados, como 16 horas de luz (Nasircilar, 2010; Rice *et al*, 2011), mientras que en el grupo de investigación en biotecnología y química de la Universidad Icesi (GIByQ) no se encontró diferencias entre periodos prolongados de luz u oscuridad con el cultivo de tejidos de la especie *Eucharis x grandiflora*.

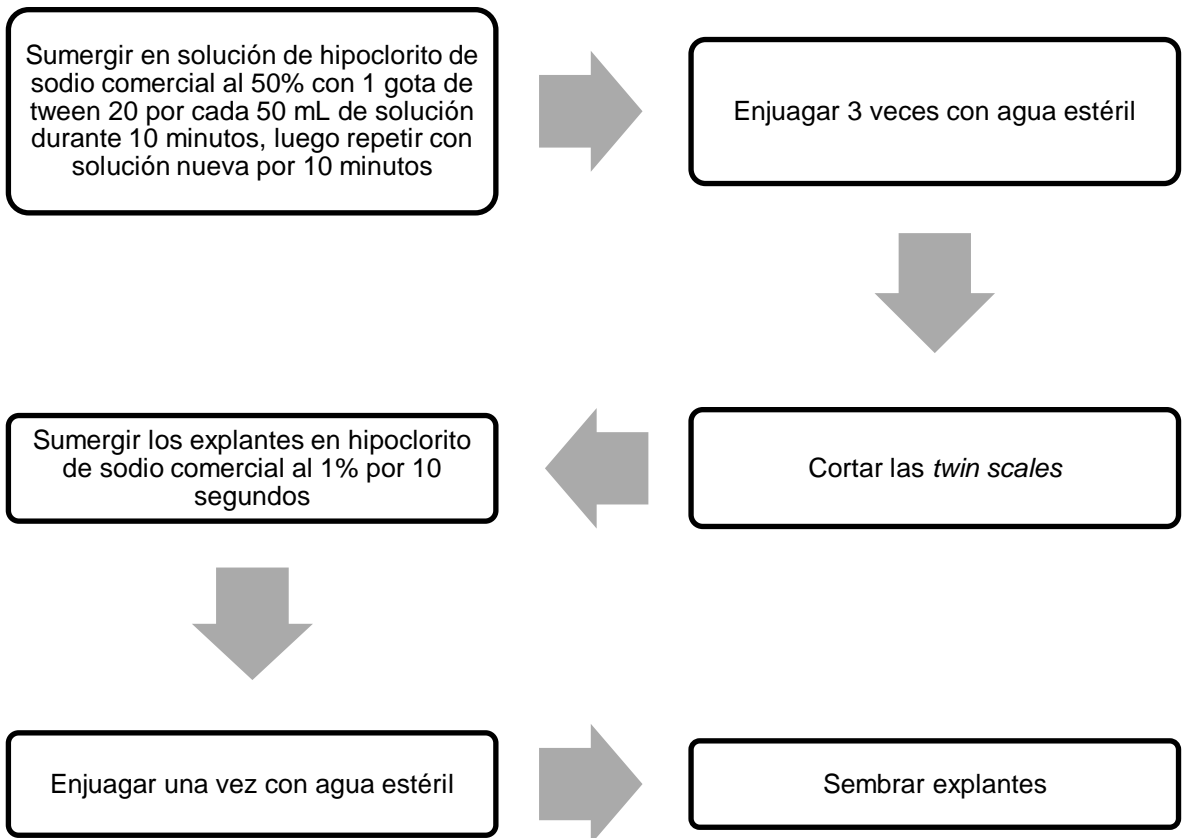
3.6 DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El material vegetal empleado en cultivo *in vitro* debe ser desinfectado para reducir la contaminación microbiológica proveniente de la planta misma. Para lograr esto se pueden usar diferentes tratamientos que ayudarán a reducir la carga microbiana, tratamientos como el uso de etanol (Yuliyana *et al*, 2009; Niño *et al*, 2005; Selles *et al*, 1999; Nasircilar, 2010; Mirici *et al*, 2005; Smith *et al*, 1999), hipoclorito de sodio (Yuliyana *et al*, 2009; Niño *et al*, 2005; Selles *et al*, 1999; Nasircilar, 2010; Mirici *et al*, 2005; Smith *et al*, 1999; Hol & Linde, 1992; Ulrich *et al*, 1999; Vargas *et al*, 2006), surfactantes (Yuliyana *et al*, 2009; Ulrich *et al*, 1999; Vargas *et al*, 2006; Niño *et al*, 2005; Selles *et al*, 1999; Mirici *et al*, 2005; Rice *et al*, 2011), agua caliente o directamente del grifo (Yuliyana *et al*, 2009; Ulrich *et al*, 1999; Hol & Linde, 1992; Vargas *et al*, 2006; Niño *et al*, 2005; Smith *et al*, 1999; Nasircilar, 2010), fungicidas y antibióticos (Vargas *et al*, 2006; Rice *et al*, 2011). Sin embargo no todos los tratamientos son completamente efectivos porque no siempre se logra una reducción en la contaminación del 100%, esto parece estar relacionado con el tamaño del bulbo y la carga microbiana que tiene cada bulbo, por este motivo los resultados en la desinfección tienden a ser variables, con una mayor tendencia a que los bulbos de mayor tamaño resulten más difíciles de descontaminar (Smith *et al*, 1999).

Con base a la información consultada se obtuvo el siguiente consenso del tratamiento de desinfección inicial:



En cabina de flujo laminar:



Y el siguiente consenso del tratamiento de desinfección para explantes ya sembrados en medios de cultivo, que presenten contaminación:



El presente trabajo provee información de base para el establecimiento de un banco de germoplasma de especies amenazadas de la familia Amaryllidaceae, evaluando el desarrollo de tejido vegetal micropropagado a partir de *Zephyranthes carinata* en diferentes concentraciones de 2 reguladores de crecimiento, contribuyendo al desarrollo de protocolos de micropropagación que puedan ser usados en establecimiento de bancos de germoplasma *ex situ* de estas especies en el país.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer un protocolo de cultivo *in vitro* para una especie de la familia Amaryllidaceae en Colombia, a partir de la técnica de *twin scales*, en bulbos de *Zephyranthes carinata*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar el crecimiento y desarrollo de los bulbillos de *Zephyranthes carinata* utilizando el medio de cultivo MS y diferentes concentraciones de 2 reguladores de crecimiento (BAP y ANA).

Establecer la respuesta de los explantes a las concentraciones utilizadas de BAP y ANA, teniendo en cuenta el número de bulbillos producidos por explante.

5. METODOLOGÍA

5.1 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE EVALUADA

El material vegetal empleado en el proyecto fue obtenido de la colección de especies de la familia Amaryllidaceae de la Universidad Icesi, en donde se encontraban varias entradas identificadas como *Zephyranthes carinata*. El material seleccionado tenía designado el código de IA-020, y consistía de 8 bulbos procedentes de una población natural en Zarzal, Valle del Cauca.

5.2 DESCRIPCIÓN DE LOS CULTIVOS

Los medios de cultivo empleados para el desarrollo del proyecto estaban conformados por: MS 4.4 g/L, sacarosa 30 g/L, phytigel 0.25% y el(los) regulador(es) de crecimiento designado(s). Los reguladores de crecimiento que fueron empleados son: bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA), los cuales se usaron en concentraciones de 0, 0.5, 1 y 2 mg/L (BAP) y 0, 0.1 y 0.25 mg/L (ANA). El pH de los medios se ajustó entre 5.50 y 5.70. Adicionalmente los cultivos se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y con un fotoperiodo de 12 horas de luz.

El medio se esterilizó a 121°C sin los reguladores de crecimiento debido a la termolabilidad de los mismos, por esto se prepararon soluciones stock de 1 mg/mL de cada regulador, las cuales fueron posteriormente esterilizadas mediante filtración por membrana de $0.22 \mu\text{m}$ y almacenadas a 8°C .

La cantidad de medio preparada era la necesaria para servir 12.5 mL en cada frasco de vidrio empleado. Posteriormente a la esterilización del medio se empleaban tres tubos falcon estériles de 50 mL para verter porciones de 12.5 mL a cada frasco de vidrio. Un tubo falcon se empleaba para adicionar el medio para los tratamientos 1 (sin reguladores de crecimiento) y los tratamientos 2, 3 y 4, los cuales no requerían ANA, otro tubo se empleaba para los tratamientos 5, 6 y 7, los cuales requerían una concentración de 0.1 mg/L de ANA, y el último tubo falcon se empleaba para adicionar el medio para los tratamientos 8, 9 y 10, los cuales requerían una concentración de 0.25 mg/L de ANA. A cada tubo se adicionaba la cantidad necesaria de la solución stock de los reguladores de crecimiento para alcanzar la concentración deseada de cada uno, según el respectivo tratamiento.

La adición se hacía de forma creciente, es decir que primero se adicionaba al tubo falcon la cantidad de medio necesaria para el tratamiento 1 y luego se vertían las porciones de 12.5 mL a cada frasco. Posteriormente se hacía lo mismo con el tratamiento 2, el tratamiento 3 y así sucesivamente.

5.3 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA ANALIZADA

La muestra analizada tiene un tamaño de 80 unidades experimentales, 10 tratamientos y 8 repeticiones por cada tratamiento, en donde cada unidad experimental corresponde a un frasco de vidrio, es decir que se tienen 8 frascos de vidrio para cada tratamiento, en los cuales se sembraron dos explantes por frasco, obteniéndose un total de 160 explantes sembrados. Adicionalmente se usó como testigo un tratamiento sin reguladores de crecimiento con *Eucharis grandiflora*. Los tratamientos fueron organizados de la siguiente forma (Tabla 1):

Tabla 1. TRATAMIENTOS EMPLEADOS

Tratamiento	BAP (mg/L)	ANA (mg/L)
1	0	0
2	0.5	0
3	1	0
4	2	0
5	0.5	0.1
6	1	0.1
7	2	0.1
8	0.5	0.25
9	1	0.25
10	2	0.25

5.4 LUGAR DE DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación fue realizada en el laboratorio de biología molecular de la Universidad Icesi, ubicado en el quinto piso del edificio L.

5.5 METODOLOGÍA EMPLEADA

Para poder evaluar el crecimiento y desarrollo de *Zephyranthes carinata* respecto al uso de los reguladores de crecimiento bencilaminopurina y ácido naftalenacético, se dividió el desarrollo del proyecto en diferentes etapas: (1) preparación de medios, (2) selección y desinfección inicial de los bulbos, (3) obtención de explantes, (4) siembra de los mismos, (5) desinfección de explantes sembrados (si se presenta contaminación), (6) observaciones, (7) manejo de los datos y (8) establecimiento del protocolo.

Los bulbos empleados se seleccionaron por peso, usándose bulbos que pesaran entre 2.80 g y 3.00 g aproximadamente. Para la desinfección de los bulbos, obtención de los explantes y la posterior siembra de los mismos se empleó una variación de la metodología descrita en el marco teórico, obtenida mediante el consenso realizado a la bibliografía revisada (Yuliyana *et al*, 2009; Niño *et al*, 2005; Selles *et al*, 1999; Nasircilar, 2010; Mirici *et al*, 2005; Smith *et al*, 1999; Hol & Linde, 1992; Ulrich *et al*, 1999; Vargas *et al*, 2006; Rice *et al*, 2011). Los cambios realizados fueron: retirar las dos capas de hojas externas antes de dejar el bulbo bajo el chorro de agua y una reducción en la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de exposición al mismo. Lo anterior se realizó con el propósito de disminuir aún más la contaminación microbiológica proveniente de la tierra y reducir el daño causado a los explantes debido a que se observó que la concentración de hipoclorito de sodio de 0.1312 % (2.5 % del hipoclorito comercial) y el tiempo de exposición de 20 minutos resultaban perjudiciales para los explantes. La metodología usada para la desinfección inicial y la obtención de los explantes fue la siguiente:

1. Retirar el bulbo de la maceta.
2. Lavar con agua la tierra, cortar las raíces y las hojas.
3. Retirar 2 capas de hojas externas del bulbo.
4. Dejar el bulbo bajo un chorro de agua 20 minutos.
5. Lavar con una solución acuosa de Extrán al 10% por 10 minutos.
6. Sumergir el bulbo en etanol al 70% por 1 minuto.

En cabina de flujo laminar:

7. Sumergir en solución de hipoclorito de sodio comercial (Clorox) al 50% (2.625% hipoclorito de sodio) con 1 gota de Tween 20 por cada 50 mL de solución durante 10 minutos, luego repetir con solución nueva por 10 minutos.
8. Enjuagar 3 veces con agua estéril.
9. Cortar las *twin scales*
10. Sumergir los explantes en hipoclorito de sodio comercial (Clorox) al 1% (0.0525% hipoclorito de sodio) por 10 segundos.
11. Enjuagar una vez con agua estéril.
12. Sembrar dos explantes por frasco.

Después de haber realizado las siembras se realizó una observación a los 15, 34 y 55 días aproximadamente para determinar la respuesta de los tejidos a los tratamientos y una observación semanal para determinar si los cultivos se encontraban contaminados.

Si los cultivos se encontraban contaminados se realizaba una desinfección de los explantes, en cabina de flujo laminar, de la siguiente manera:

1. Sumergir el explante en solución de hipoclorito de sodio comercial (Clorox) al 1% (0.0525%) con 1 gota de Tween 20 por cada 50 mL de solución durante 5 minutos, luego repetir con solución nueva por otros 5 minutos.
2. Enjuagar con agua estéril para retirar la solución de hipoclorito y sembrar en medio nuevo.

Dado el tiempo requerido para realizar los procedimientos descritos se escalonó la siembra de las 8 repeticiones por tratamiento, procediendo entonces a sembrar las repeticiones en días diferentes. Primero se sembraron las repeticiones 1, 2, 3 y el testigo en un mismo día, después se sembró la repetición 4, luego la 5, posteriormente la 6 y la 7 en un mismo día y finalmente la repetición 8. Para el testigo se usó un bulbo de *Eucharis grandiflora* de 3.793 g. En las diferentes siembras de *Zephyranthes carinata* se emplearon: para las repeticiones 1, 2 y 3 dos bulbos de 2.960 g y 2.927 g de los cuales se obtuvieron 60 explantes en total, en las repeticiones 4 y 5 se usó un bulbo para cada repetición, de 2.850 g y 2.876 g respectivamente, obteniéndose de esta forma 20 explantes por cada bulbo (40 explantes en total). En las repeticiones 6 y 7 se emplearon 2 bulbos de 2.856 g y 2.890 g a partir de los cuales se obtuvieron 40 explantes en total y en la repetición 8 se usó un bulbo de 2.917 g de donde se obtuvieron 44 explantes, de los cuales se sembraron 20 para la repetición 8.

5.6 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE LOS EXPLANTES

La respuesta se midió de forma cualitativa y cuantitativa. Cualitativamente se observó cuántos explantes respondieron por tratamiento, entendiéndose respuesta como la aparición de bulbillos y/o hojas. Cuantitativamente se midió el diámetro de los bulbillos y la longitud de la hoja más larga en cada bulbillito. Finalmente para cumplir con los objetivos del proyecto se compararon los datos obtenidos para determinar el tratamiento que generó una mayor cantidad de hojas y/o bulbillos en el tiempo establecido, es decir identificar que el tratamiento que logra una respuesta más rápida. Adicionalmente se presenta evidencia fotográfica de lo observado.

Para la medición de las hojas y la toma de las fotografías se retiró las plántulas de los medios de cultivo y posteriormente se empleó material previamente

esterilizado en autoclave a 121°C para medir las hojas. Para prevenir la contaminación de las plántulas, los bulbillos fueron medidos con una regla sin ser retirados de los frascos de vidrio. Las fotos fueron tomadas usando un estereoscopio con cámara, Nikon SMZ800, dentro de una cabina de seguridad.

5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) en el software minitab con un nivel de confianza del 95% usando los datos recolectados sobre las observaciones cualitativas realizadas a los 50-55 días de haber realizado cada siembra, es decir los datos correspondientes al número de explantes que respondieron a cada tratamiento, con el fin de comparar los diferentes tratamientos y determinar si había diferencias significativas entre los mismos.

5.8 MATRIZ DE MARCO LÓGICO

Tabla 2. MATRIZ DE MARCO LÓGICO

Objetivo General			
Estandarizar un protocolo de cultivo <i>in vitro</i> para una especie (<i>Zephyranthes carinata</i>) de la familia Amaryllidaceae en Colombia, incluyendo el efecto de la presencia en 2 reguladores de crecimiento, para junio del 2014.			
Objetivo específico	Actividades	Supuestos	Indicador
Evaluar el crecimiento y desarrollo de la especie designada respecto al uso de 2 reguladores de crecimiento (BAP y ANA) a diferentes concentraciones, usando un medio de cultivo preestablecido.	Preparar medios Selección de bulbos. Desinfectar bulbos. Obtención de explantes mediante <i>twin scaling</i> . Sembrar explantes. Observar crecimiento y desarrollo	Disponibilidad de material vegetal. Protocolo de desinfección resulta efectivo. Disponibilidad de equipos materiales necesarios para obtener explantes y realizar la siembra. Diferencias en el desarrollo dependiendo de la concentración y el	Registros fotográficos y medidas de los cambios observados en los explantes sembrados.

	Comparar el crecimiento y desarrollo en los diferentes tratamientos.	regulador de crecimiento empleado.	
Establecer un protocolo en el cual se presente una respuesta más temprana de la especie evaluada (<i>Zephyranthes carinata</i>), teniendo en cuenta el tiempo que tardan en aparecer los bulbillos y el número de bulbillos que se obtienen por explante.	Establecer el o los reguladores que generan un desarrollo y crecimiento óptimo. Establecer la concentración de regulador o reguladores de crecimiento que generaron el crecimiento óptimo. Escritura del protocolo.	Hay respuesta a los diferentes tratamientos	Obtención del protocolo

6. RESULTADOS

6.1 DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El tratamiento de desinfección inicial resultó efectivo, lográndose obtener bajos porcentajes de contaminación para la mayoría de las siembras realizadas, incluso obteniendo porcentajes de contaminación del 0% a los 55 días de haber realizado algunas siembras, como se muestra en la tabla 3. La siembra que tuvo más contaminación fue la primera, la cual corresponde a las repeticiones 1, 2 y 3. Esta contaminación se observó a los 8 días y no pudo ser erradicada con el tratamiento establecido para desinfectar los explantes presentes en medios contaminados, por lo tanto permanecieron contaminados hasta la finalización de la investigación. En la segunda siembra, la cual corresponde a la repetición 4, solo se contaminó una unidad experimental de las 10 sembradas, esta contaminación solo apareció después de obtener la evidencia fotográfica de las observaciones realizadas a las 9 semanas de crecimiento. En la tercera y cuarta siembras no se presentó contaminación alguna, mientras que en la quinta siembra solo se contaminó una unidad experimental de las 10 sembradas.

El tipo de contaminación observada tenía un aspecto blanco y lechoso característico del crecimiento bacteriano y no se observó crecimiento de hongos. El análisis de estos resultados será abordado en la sección de discusión de este documento.

Tabla 3. PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN

	Primera siembra (repetición es número 1, 2 y 3)	Segunda siembra (repetición número 4)	Tercera siembra (repetición número 5)	Cuarta siembra (repeticiones número 6 y 7)	Quinta siembra (repetición número 8)
Unidades experimentales contaminadas	14 de 30	1 de 10	0 de 10	0 de 20	1 de 10
Contaminación (%)	47%	10%	0%	0%	10%

6.2 EXPLANTES QUE RESPONDIERON A LOS TRATAMIENTOS

En esta sección se presenta la información correspondiente al número de explantes que respondieron por tratamiento, es decir el número de explantes que desarrollaron hojas y/o bulbillos, a partir de las *twin-scales*. Se observó que la gran mayoría de los explantes que respondieron primero desarrollaron un bulbillo y posteriormente hojas. Solo dos explantes, correspondientes al tratamiento 8 repetición 7 (Figura 1) y tratamiento 10 repetición 4 (Figura 2), no desarrollaron bulbillos pero sí hojas.



Figura 1. Tratamiento 8 repetición 7 (58 días de cultivo)



Figura 2. Tratamiento 10 repetición 4 (64 días de cultivo)

Adicionalmente el tratamiento 10 repetición 4 presentó, a partir de los 33 días de cultivo, 5 estructuras rígidas que no se lograron identificar (Figura 2). Las hojas de los dos explantes anteriormente mencionados eran rígidas y retorcidas, por este motivo no fue posible desdoblarlas para tomar la longitud de las mismas. Esta forma que tomaban algunas de las hojas también se presentó en otros tratamientos y se caracterizaba porque dichas hojas no se originaban de un

bulbillo. Sin embargo estos explantes lograron desarrollar bulbillos y posteriormente sus propias hojas, como se observa para el tratamiento 7 repetición 6 (Figuras 3 y 4).

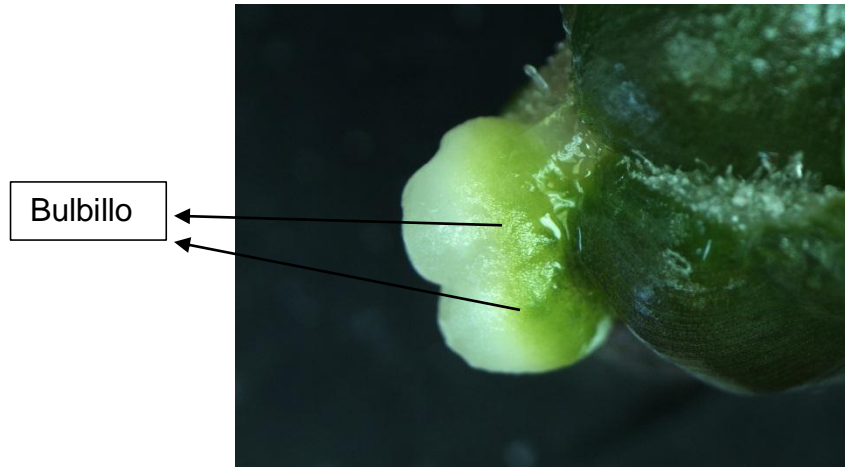


Figura 3. Tratamiento 7 repetición 6 (58 días de cultivo)

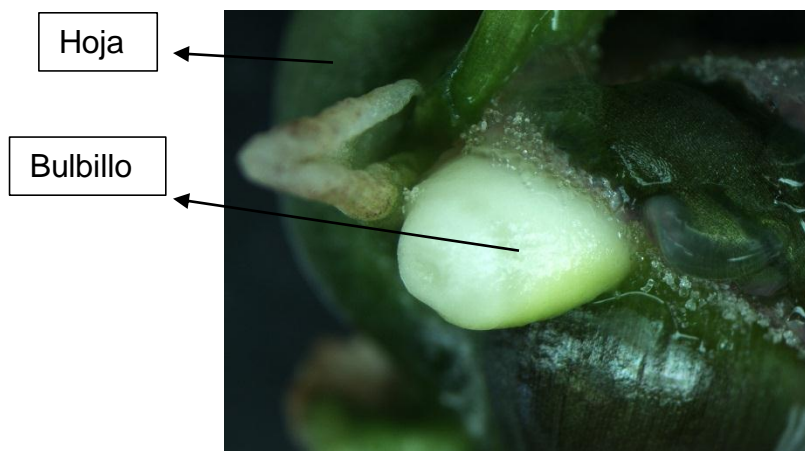


Figura 4. Tratamiento 7 repetición 6 (58 días de cultivo)

Se encontró que el tratamiento en el cual respondieron una mayor cantidad de explantes es el número 2 (figura 5), correspondiente a una concentración de 0.5 mg/L de BAP y 0 mg/L de ANA, en donde respondieron 5 explantes de un total de 16. También se encontró que para el tratamiento 9 no respondió ninguno de los explantes (Anexo, tratamiento 9). Estos resultados se pueden observar en la tabla 4. Adicionalmente se observó que en el testigo solo 9 de 16 explantes desarrollaron bulbos y hojas.



Figura 5. Tratamiento 2 repetición 2 (62 días de cultivo)

A continuación se presenta la información correspondiente al número de explantes que respondieron por tratamiento, en donde el tamaño de muestra para cada tratamiento es 16, debido a que son 2 explantes por unidad experimental y se tienen 8 unidades experimentales por tratamiento, es decir 8 repeticiones.

Tabla 4. RESPUESTA GENERAL DE LAS 8 REPETICIONES

Tratamiento	BAP (mg/L)	ANA (mg/L)	Explantes que respondieron a los 15-20 días	Explantes que respondieron a los 33-36 días	Explantes que respondieron a los 50-55 días	Porcentaje de respuesta a los 50- 55 días
1	0	0	1	3	4	25%
2	0,5	0	2	5	5	31%
3	1	0	1	3	3	19%
4	2	0	2	2	3	19%
5	0,5	0,1	0	0	1	6%
6	1	0,1	1	3	4	25%
7	2	0,1	2	3	3	19%
8	0,5	0,25	1	1	2	13%
9	1	0,25	0	0	0	0%
10	2	0,25	0	1	1	6%

6.2.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Las hojas más largas provenientes de los bulbillos corresponden al tratamiento 6, repetición 4, y al tratamiento 2, repetición 2 (tabla 5). Mientras que las hojas más pequeñas se obtuvieron para el tratamiento 3 (figura 6, tabla 5). Se observó que

los explantes bajo el tratamiento 9 no presentaron desarrollo de hojas ni respuesta alguna (tabla 4) y que el tratamiento 10 presentaba hojas que no se pudieron medir dada la rigidez y forma que tenían. También se observó que la mayoría de los bulbillos desarrollaban entre 3 y 4 hojas cada uno (tabla 5).

Tabla 5. LONGITUD DE LA HOJA MÁS LARGA POR BULBILLO

Tratamiento	Repetición	Longitud (cm)	Número de hojas
1, control	4	2,8	3
	5	6,8	3
		4,7	3
		7,5	3
		7,0	3
	7	5,9	3
2	1	4	3
	2	10,3	4
	4	2,8	3
		8	4
	5	2,4	4
3	1	3,2	3
	5	2,8	3
	6	0,9	1
		2,1	3
4	2	3,4	2
	5	7,4	3
	6	6,7	3
5	1	5,7	3
6	4	15,1	5
		4,9	4
	8	5,8	1
7	5	7,1	4
8	5	3,4	1

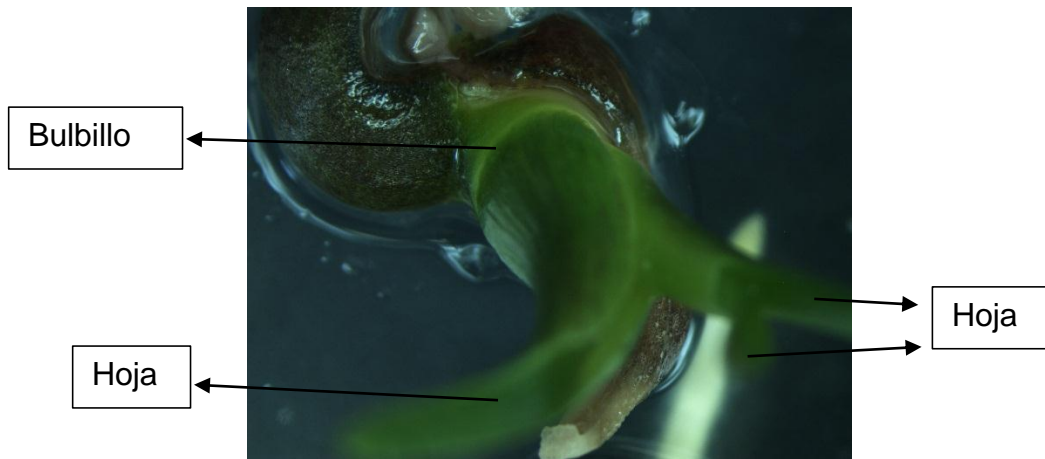


Figura 6. Tratamiento 3 repetición 6 (58 días de cultivo)

Se contó el número de bulbillos obtenidos para cada tratamiento a los 50 días de haber realizado la última siembra, esta información se encuentra registrada en la tabla 6. Se encontró que el tratamiento que mayor número de bulbillos produjo fue el 7 (figura 3 y 4), seguido del 1 o control (figura 7) y el 8 (figuras 8 y 9), en donde se obtuvieron 11, 8 y 8 bulbillos respectivamente. Sin embargo solo un explante del tratamiento 8 generó 8 bulbillos (figuras 8 y 9), siendo este el explante con mayor número de bulbillos generados en todo el estudio.

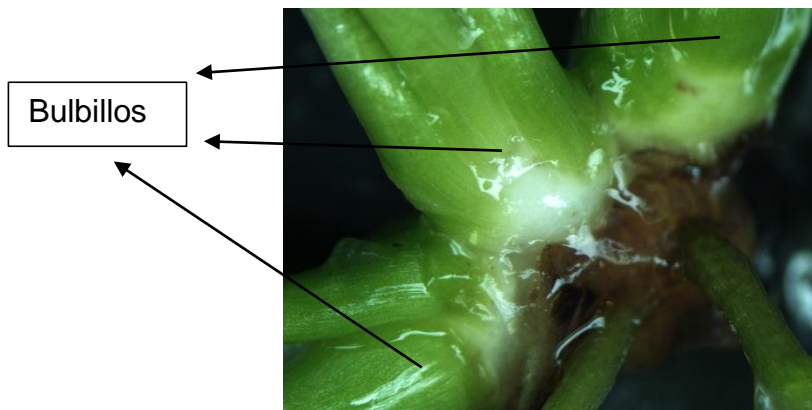


Figura 7. Tratamiento 1 repetición 5 (83 días de cultivo)



Figura 8. Tratamiento 8 repetición 5 (66 días de cultivo)

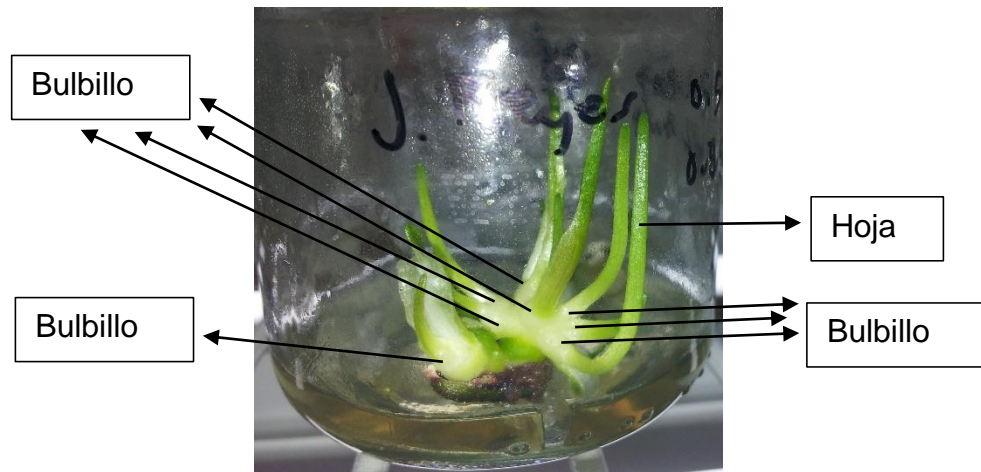


Figura 9. Tratamiento 8 repetición 5 (87 días de cultivo)

Adicionalmente se midió el diámetro de los bulbillos a los 50 días de haber realizado la última siembra con el fin de obtener un diámetro promedio de bulbillo por tratamiento (tabla 6). De acuerdo a los resultados anteriores el tratamiento que presentó un mayor diámetro promedio fue el tratamiento 2 (figura 10). Se debe destacar que debido a que los datos presentes se tomaron a los 50 días de la última siembra, es decir la correspondiente a la repetición número 8, los explantes de las otras repeticiones tuvieron más tiempo para producir bulbillos nuevos. Los bulbillos que se desarrollaron recientemente son aquellos que tienen diámetros inferiores o iguales a 0.2 cm. También se observó que los tratamientos 9 y 10 no generaron desarrollo de bulbillos en los explantes.

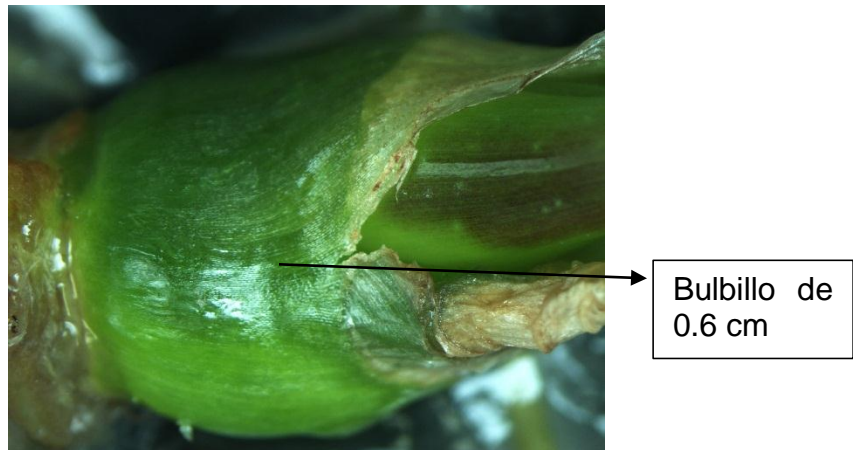


Figura 10. Tratamiento 2 repetición 4 (107 días de cultivo)

Tabla 6. DIÁMETRO DE LOS BULBILLOS

Tratamiento	Repetición	Explantos con bulbillo	Bulbillos por explante	Total de bulbillos obtenidos	Diámetro (cm)	Promedio (cm)
1	3	1 de 2	1	8	0,2	0,313
	4	1 de 2	1		0,4	
	5	2 de 2	1		0,4	
			3		0,4	
		0,2				
		0,2				
		0,3				
6	1 de 2	1	0,3			
7	1 de 2	1	0,4			
2	1	1 de 2	1	5	0,4	0,460
	2	1 de 2	1		0,4	
	4	2 de 2	1		0,6	
			1		0,3	
	5	1 de 2	1		0,6	
3	1	1 de 2	1	4	0,4	0,350
	5	1 de 2	1		0,4	
	6	2 de 2	1		0,3	
			1		0,3	
4	2	1 de 2	1	6	0,3	0,383
	5	2 de 2	1		0,4	

			3		0,4	
					0,4	
					0,4	
	6	1 de 2	1		0,4	
5	1	1 de 2	3	3	0,4	0,400
					0,4	
					0,4	
6	4	2 de 2	1	4	0,5	0,425
			1		0,5	
	6	1 de 1	1		0,3	
	8	1 de 2	1		0,4	
7	1	1 de 2	3	11	0,2	0,236
					0,1	
					0,2	
	4	1 de 2	2		0,2	
					0,2	
	5	2 de 2	2		0,4	
					0,4	
					1	
	6	1 de 2	3	0,2		
				0,2		
				0,3		
8	5	1 de 2	8	8	0,3	0,238
					0,2	
					0,2	
					0,3	
					0,3	
					0,2	
					0,2	
					0,2	

6.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Según el análisis de varianza (ANOVA) realizado a los datos correspondientes al número de explantes que respondieron por cada unidad experimental en cada tratamiento (tabla 4), entendiéndose respuesta como el desarrollo de hojas y/o bulbillos, y de acuerdo a las siguientes hipótesis:

H₀: Todos los tratamientos son significativamente iguales

H₁: Todos los tratamientos son significativamente diferentes

Se encontró que debido a que el valor p (0.482) es mayor que el alfa (0.05), no es posible rechazar la hipótesis nula (H₀), es decir que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. A continuación se presenta la tabla de análisis de varianza obtenida:

Tabla 7. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) RESPECTO AL NÚMERO DE EXPLANTES QUE RESPONDIERON POR CADA TRATAMIENTO

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor de F	Valor P
Tratamiento	9	2,800	0,311	0,96	0,482
Error	70	22,750	0,325		
Total	79	25,550			
S = 0,5701 R-cuad. = 10,96% R-cuad. (Ajustado)= 0,00%					

7. DISCUSIÓN

7.1 DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

De acuerdo a los porcentajes de contaminación obtenidos para las diferentes siembras se puede afirmar que el tratamiento de desinfección inicial resulta efectivo, a excepción de la primera siembra, la cual presenta un porcentaje de contaminación del 47%. Este alto porcentaje de contaminación en la primera siembra y la posterior disminución de la contaminación en las siembras siguientes se atribuyen al desarrollo de la destreza del investigador al momento de obtener los explantes y sembrarlos, reduciendo de esta forma el tiempo que el bulbo y los explantes permanecían expuestos al aire dentro de la cabina de flujo laminar. Adicionalmente se atribuye a que en la primera siembra se obtuvieron todas las *twin scales* y posteriormente se realizó la desinfección de las mismas, mientras que en las siembras siguientes se obtenían, se desinfectaban y se sembraban inmediatamente porciones de cinco *twin scales* sucesivamente hasta obtener el total de explantes requeridos para la siembra, logrando de esta forma reducir el tiempo entre la obtención de cada explante y la siembra de los mismos. La contaminación que se presentó en la segunda siembra es producto de la manipulación de las plántulas durante la toma de las fotografías porque solo se presentó después de haber realizado este proceso en la semana 10 de cultivo.

Si bien el tratamiento de desinfección inicial del bulbo resultó efectivo, el tratamiento de desinfección de los explantes sembrados que resultaron contaminados, a causa de la contaminación introducida por el investigador, no fue efectivo porque después de realizar este proceso no se logró descontaminar los explantes sin importar cuantas veces se repitiera el procedimiento. Lo anterior podría solucionarse aumentando la concentración de hipoclorito de sodio o el tiempo de exposición al mismo. Sin embargo, debido a que concentraciones más altas de hipoclorito pueden resultar perjudiciales para los explantes posiblemente la mejor opción sea aumentar el tiempo de exposición.

7.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Según los resultados obtenidos en la tabla 6 es posible afirmar que el tratamiento 3 fue el que generó hojas más pequeñas, con longitudes de 3.2, 2.8, 0.9 y 2.1 cm, y las repeticiones 2 y 4 de los tratamientos 2 y 6, respectivamente, generaron las hojas más largas, con longitudes máximas de 10.3 y 15.1 cm respectivamente. También se observó que la mayor parte de los bulbillos generados desarrollaron entre 3 y 4 hojas a los 55 días de cultivo. Adicionalmente, debido al bajo número

de explantes que respondieron para la mayoría de los tratamientos a los 55 días, en donde se observó una tendencia de respuesta menor o igual a 3 explantes por tratamiento, y la longitud de las hojas obtenidas, se pueden establecer dos tratamientos como los que mejor resultados presentaron: los tratamientos 1 (control) y 2 (0.5 mg/L de BAP, 0 mg/L ANA). Estos presentaron una mayor respuesta, como se muestra en la tabla 4, y en la cantidad de bulbillos desarrollados, 8 y 5 respectivamente, como se puede observar en la tabla 6. Además, presentaron longitudes de hojas mayores que los otros tratamientos según las tablas 9 y 10. Sin embargo, las diferencias entre el número de explantes que respondieron y la longitud de las hojas de los tratamientos 1 y 2 no son muy marcadas.

Al comparar la cantidad de bulbillos producidos y los diámetros de los mismos se puede establecer que si bien en los tratamientos 1 (control), 7 y 8 se observó una mayor cantidad de bulbillos, es el tratamiento 2 el que presenta el mayor diámetro promedio en los bulbillos. Esto es indicativo de que este tratamiento generó un desarrollo más rápido que los demás, promoviendo el crecimiento de los nuevos bulbillos. Además dado que en el tratamiento 8 solo 1 explante de 16 respondió desarrollando 8 bulbillos, no puede afirmarse que este tratamiento vaya a generar gran cantidad de bulbillos debido a la baja reproducibilidad de este resultado. Adicionalmente al comparar los resultados con el control, es decir el tratamiento 1, se puede apreciar que no existe una diferencia grande en el diámetro promedio de bulbillos del tratamiento 2 y el control. También se observa que la mayoría de los tratamientos no generaron mayor cantidad de bulbillos comparados con el control sin reguladores de crecimiento. Sin embargo, por otra parte se pudo establecer que los tratamientos 9 y 10 (1 y 2 mg/L de BAP + 0.25 mg/L de ANA) no resultaron apropiados para promover el desarrollo de plantas a partir de explantes de *Zephyranthes carinata* debido a que no se observaron bulbillos en el tiempo que trascurrió la investigación, justo como se observa en la tabla 6.

7.3 NÚMERO DE EXPLANTES QUE RESPONDIERON

Con base en los resultados mostrados en la tabla 5 se puede observar que el tratamiento que generó un crecimiento más rápido y una mayor respuesta fue el 2 (0.5 mg/L de BAP), sin embargo no presenta una diferencia muy grande al comparar este tratamiento con el tratamiento 1, o de control. Por otra parte al analizar la tabla de análisis de varianza obtenida mediante el software minitab, se puede observar que el valor p obtenido es mayor que el alfa, indicando de esta manera que no es posible rechazar la hipótesis de que todos los tratamientos son significativamente iguales, y por lo tanto se establece mediante este análisis que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, lo anterior no va acorde con los resultados observados puesto que sí se observan diferencias a nivel biológico. Esto puede ser debido a que el tamaño de muestra es muy

pequeño para que estadísticamente se noten diferencias al nivel de significancia trabajado.

En el trabajo de Rice *et al* (2011), en el cual evaluaron diferentes concentraciones de BAP y ANA en *Brunsvigia undulata* haciendo uso de la técnica de *twin scaling* para obtener los explantes, también se encontró que los diferentes tratamientos no resultaban mejor que el control. Lo anterior se atribuyó a que el bulbo contenía la concentración suficiente de reguladores de crecimiento endógenos para inducir la formación de bulbillos, lo cual también puede estar sucediendo en *Zephyranthes carinata*.

Existen otros factores que pudieron haber afectado los resultados obtenidos en este trabajo: el primero es el tamaño de las *twin scales* generadas pues se observó que cuando se obtenía un gran número de explantes por bulbo, es decir que los explantes eran más pequeños, estos tenían una respuesta menor que los explantes de mayor tamaño. Lo anterior se puede apreciar en la primera y última siembra en donde se generó un mayor número de explantes por bulbo y por lo tanto explantes de menor tamaño, y la respuesta de ambas fue menor comparado con las demás siembras. Otro factor que pudo haber afectado es el tiempo en que se realizaron las siembras, pues las siembras se desarrollaron de manera escalonada en días diferentes y por lo tanto se introduce cierta variabilidad debido a cambios en factores aleatorios sobre los que no se tiene control como las condiciones ambientales y variaciones en el estadio o metaboloma de las plantas de donde se obtienen los explantes.

La presente investigación logra evaluar el crecimiento y desarrollo de *Zephyranthes carinata* en presencia de los reguladores de crecimiento BAP y ANA en las concentraciones establecidas para los tratamientos que se pueden apreciar en la tabla 1. Adicionalmente aporta información preliminar acerca del tratamiento que podría presentar mejores resultados en futuras investigaciones, el cual es el tratamiento 2 (0.5 mg/L de BAP) dado el número de explantes que respondieron, el tiempo que tarda en responder, la cantidad de bulbillos y el diámetro de los mismos. También brinda información sobre los tratamientos que probablemente no vayan a resultar efectivos, pues a mayores concentraciones de BAP y ANA se obtuvo menor producción de bulbillos.

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que el tratamiento de desinfección inicial resulta apropiado para la reducción de la carga microbiana del bulbo proveniente de cultivo en tierra, mientras que el tratamiento de desinfección de los explantes contaminados no resultó apropiado. También se concluye que los tratamientos 9 y 10 no lograron generar el desarrollo de bulbillos, en el tiempo en que se llevó a cabo la investigación, y por lo tanto podrían resultar poco efectivos para la micropropagación de *Zephyranthes carinata* en futuras investigaciones.

Por otra parte este trabajo provee información preliminar para la estandarización de un protocolo de micropropagación de *Zephyranthes carinata* mediante la técnica de *twin scaling*. Por lo tanto se espera que la información provista en este trabajo contribuya a investigaciones posteriores que hagan uso de la técnica *twin scaling* para micropropagar a *Zephyranthes carinata* y otras especies afines.

8. CONCLUSIONES

- El tratamiento de desinfección inicial empleado en la reducción de la contaminación bacteriana proveniente de los bulbos cultivados en tierra resultó efectivo.
- La experticia adquirida por el investigador permitió reducir la contaminación introducida por el mismo.
- Mayores concentraciones de BAP y ANA (tratamientos 9 y 10) no inducen formación de bulbillos.
- La concentración de 0.5 mg/L de BAP (tratamiento 2) en el medio de crecimiento permite obtener bulbillos más rápidamente y de mayor tamaño que otras concentraciones probadas de BAP o de ANA.
- Se logra obtener un protocolo de cultivo *in vitro* mediante la obtención de información que permite establecer un tratamiento de desinfección efectivo y un acercamiento a la concentración de los reguladores de crecimiento BAP y ANA que se debe emplear para obtener una respuesta más rápida, con bulbillos de mayor tamaño y en mayor cantidad que en el control.

9. RECOMENDACIONES

A continuación se presentan algunas recomendaciones que se deben tener en cuenta para concretar la estandarización de un protocolo de cultivo *in vitro* de *Zephyranthes carinata* y obtener una mayor reproducibilidad en los datos obtenidos:

- Dado que el tratamiento de desinfección de los explantes sembrados que resultaron contaminados durante el cultivo *in vitro* no fue efectivo se deben evaluar diferentes tratamientos de desinfección, variando concentración y tiempo de exposición al desinfectante, con el propósito de encontrar las condiciones que permitan reducir la contaminación sin que el proceso resulte perjudicial para el explante.
- Para reducir la variabilidad generada por factores aleatorios se debe realizar la siembra de todas las repeticiones de todos los tratamientos en un mismo día.
- Se debe evaluar el desarrollo que presentan las *twin scales* en función de su lugar de origen en el bulbo, es decir si se obtienen de regiones más cercanas al centro del bulbo o por el contrario si son obtenidas de la parte más externa del bulbo, con el fin de identificar qué región del bulbo presenta una mayor respuesta.
- Se deben realizar más estudios para obtener información más contundente que corrobore la reproducibilidad de los resultados obtenidos en este estudio, así como también evaluar otros reguladores de crecimiento.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bach, A., & Sochacki, D. (2012). Propagation of Ornamental Geophytes, Physiology and Management Systems. En R. Kamenetsky, & H. Okubo, *Ornamental Geophytes: From Basic Science to Sustainable Production* (págs. 261-278). CRC Press.
- Bin, H., Shu-Fang, S., & Qing-Jie, Z. (2013). Cytotoxic and Antimalarial Amaryllidaceae Alkaloids from the Bulbs of *Lycoris radiata*. *Molecules*, 18(3), 2458-2468.
- de Andrade, J., Berkov, S., Viladomat, F., Codina, C., Zuanazzi, J. S., & Bastida, J. (2011). Alkaloids from *Hippeastrum papilio*. *Molecules*, 16(8), 7097-7104.
- El Tahchy, A., Boisbrun, M., Ptak, A., Dupire, F., Chrétien, F., Henry, M., & Laurain-Mattar, D. (2010). New method for the study of Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis using biotransformation of deuterium-labeled precursor in tissue cultures. *Acta Biochimica Polonica*, 57(1), 75-82.
- García-Águila, L., de Feria, M., & Acosta, K. (2007). Aspectos básicos de la conservación in vitro de germoplasma vegetal. (Spanish). *Biotecnología Vegetal*, 7(2), 67-79.
- Hol, G.M.G.M. & Linde, P.C.G. (1992). Reduction of contamination in bulb-explant cultures of *Narcissus* by a hot-water treatment of parent bulbs. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31, 75-79.
- Kohut, E., Ördögh, M., Jámbor-Benczúr, E. & Máthé, Á. (2007). Results with the establishment of *in vitro* culture of *Leucojum aestivum*. *International Journal of Horticultural Science*, 13 (2), 67–71.
- Mirici, S., Parmaksiz, I., Özcan, S., Sancak, C., Uranbey, C. Sarihan, E., Gümüşcü, A., Gürbüz, B. & Arslan, N. (2005). Efficient *in vitro* bulblet regeneration from immature embryos of endangered *Sternbergia fischeriana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80, 239–246.
- Nasircilar, A., Mirici, S., Karagüzel, Ö., Eren, Ö., & Baktir, İ. (2011). *In vitro* propagation of endemic and endangered *Muscari mirum* from different explant types. *Turkish Journal Of Botany*, 35(1), 37-43.
- Niño, O., Correa, Y., Mosquera, O. y Ramirez, L. (2005). Cuantificación de licorina en callos y raíces cultivados *in-vitro* de *crinum x powelli* "album" (amaryllidaceae) por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). *Scientia et Technica Año XI*, 29, 83-88.

Peng, W., Hui-Hui, Y., Xue, Z., Yun-Ping, L., Lu-Qing, S., & Zheng, Y. (2014). Novel Lycorine Derivatives as Anticancer Agents: Synthesis and In Vitro Biological Evaluation. *Molecules*, 19(2), 2469-2480.

Ptak, A., El Tahchy, A., Dupire, F., Boisbrun, M., Henry, M., Chapleur, Y. & Laurain-Mattar, D. (2009). LCMS and GCMS for the screening of alkaloids in natural and *in vitro* extracts of *Leucojum aestivum*. *Journal Of Natural Products*, 72(1), 142-147.

Razdan, M., O. (2003). Introduction to Plant Tissue Culture. (Segunda edición). Science Publishers. 375 páginas.

Rice, L. J., Finnie, J. F., & Van Staden, J. J. (2011). *In vitro* bulblet production of *Brunsvigia undulata* from twin-scales. *South African Journal Of Botany*, 77(2), 305-312.

Roca, W., M. & Mroginski, L., A. (1991). Establecimiento de cultivos vegetales *in vitro* y Propagación clonal *in vitro*. En *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. (págs. 19- 36 y 95-117). CIAT.

Sánchez-Chiang, N., & M. Jiménez, V. (2010). Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. (Spanish). *Agronomía Mesoamericana*, 21(1), 193-205.

Sellés, M., Viladomat, F., Bastida, J. y Codina, C. (1999). Callus induction, somatic embryogenesis and organogénesis in *Narcissus confusus*: correlation between the state of differentiation and the content of galanthamine and related alkaloids. *Plant Cell Reports*, 18, 646–651.

Silverstone-Sopkin, P. A. (2011). Los muertos vivientes: la historia natural de cuatro lirios amazónicos del suroccidente de Colombia (*Eucharis* y *Plagiolirion*, Amaryllidaceae). (Primera edición). Cali: Universidad del Valle. 97 páginas.

Smith, R., Burrows, J. & Kurten, K. (1999). Challenges associated with micropropagation of *Zephyranthes* and *Hippesastrum sp* (Amaryllidaceae). *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 35(4), 281-282.

Ulrich, M., Davies, T., Yong Cheong Koh, Duray, S. & Egilla, N. (1999). Micropropagation of *Crinum`Ellen Bosanquet'* by tri-scales. *Scientia Horticulturae*, 82, 95-102.

Vargas, T., Oropeza, M. y García, E. (2006). Propagación *in vitro* de *Hippeastrum sp*. *Agronomía Tropical*, 56(4), 621-626.

Yuliyana, B., Tatyana, S., Stanislav, Y., Bozhidarka, P., Emil, M., Monique, B., & Marina, S. (2009). Influence of plant origin on propagation capacity and alkaloid

biosynthesis during long-term *in vitro* cultivation of *Leucojum aestivum* L. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45(4), 458-465.

Zayed, R., El-Shamy, H., Berkov, S., Bastida, J. & Codina, C. (2011) *In vitro* micropropagation and alkaloids of *Hippeastrum vittatum*. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 47, 695–701.

11. ANEXOS

11.1 EVIDENCIA FOTOGRÁFICA

Tratamiento
1 (control)



Repetición 4, 90 días de cultivo



Repetición 5, 83 días de cultivo



Repetición 7, 58 días de cultivo

Tratamiento
2



Repetición 1, 98 días de cultivo



Repetición 4, 107 días de cultivo



Repetición 5, 83 días de cultivo

Tratamiento
3



Repetición 1, 98 días de cultivo



Repetición 5, 83 días de cultivo



Repetición 6, 58 días de cultivo

Tratamiento
4



Repetición 2, 115 días de cultivo

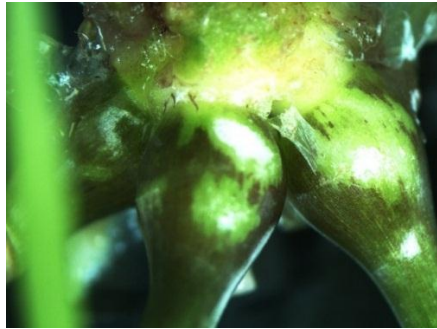


Repetición 5, 83 días de cultivo



Repetición 6, 41 días de cultivo

Tratamiento
5



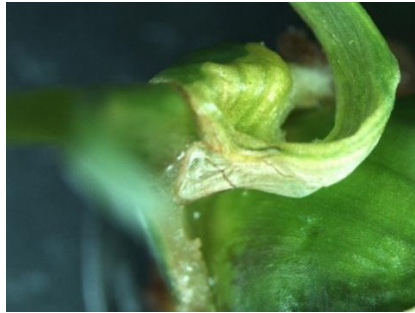
Repetición 1, 98 días de cultivo

Tratamiento
6



Repetición 4, 90 días de cultivo

Tratamiento
7



Repetición 5, 66 días de cultivo

Tratamiento
9



Repetición 7, 58 días de cultivo.