

OPTIMIZACIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Zephyranthes carinata*

MARIA CAMILA GÓMEZ RESTREPO

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

PROGRAMA DE BIOLOGÍA, DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SANTIAGO DE CALI

2017

OPTIMIZACIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Zephyranthes carinata*

MARIA CAMILA GÓMEZ RESTREPO

Proyecto de grado para optar por el título de pregrado en BIOLOGÍA

Tutora: Zaida Lentini Gil, Ph.D

Co-tutora: María Eugenia Buitrago

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

PROGRAMA DE BIOLOGÍA, DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SANTIAGO DE CALI

2017

**APROBADO**

---

Zaida Lentini Ph.D  
Directora del proyecto

---

Maria Eugenia Buitrago BSc.  
Co-directora del proyecto

## AGRADECIMIENTOS

Primero agradezco a la doctora Zaida Lentini por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto de grado y por su permanente atención y dedicación durante el proceso. Segundo, a mi co-directora Maria Eugenia Buitrago quien siempre me acompañó y me brindó de sus conocimientos en cultivo de tejidos *in vitro*.

A Eddie Tabares por sus sabios consejos en cultivo de tejidos *in vitro* y Freddy Vanegas por su dedicación durante las primeras semanas de inducción al Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

A mis compañeros del Laboratorio, Isabela Barragán, Sebastián Rey, Geraldine Restrepo por tener toda la disposición y motivación en ayudarme cuando más lo necesitaba. Quiero agradecer a mi familia, especialmente a mi mamá, por su apoyo incondicional durante mi formación profesional. También quiero agradecer a mis inolvidables amigas de la universidad con quienes compartí momentos únicos, inmemorables y llenos de carcajadas.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUCCIÓN.....	11
2 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	14
2.1 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN.....	14
2.2 MARCO TEÓRICO.....	15
2.2.1 Familia Amaryllidaceae.....	15
2.2.2 Género <i>Zephyranthes</i> .....	17
2.2.3 Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.....	18
2.2.4 Embriogénesis somática.....	19
2.2.5 Embriogénesis somática en Amaryllidaceae.....	19
2.2.6 Factores que afectan la embriogénesis somática.....	20
2.3 OBJETIVOS.....	24
Objetivo general.....	24
Objetivos específicos.....	24
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
2.4.1 Material vegetal de partida recolectado del invernadero.....	24
2.4.2 Protocolo de desinfección del material vegetal.....	25
2.4.3 Introducción del material al cultivo <i>in vitro</i> .....	27
2.4.4 Inducción de bulbillos a partir de bulbos de plantas cultivadas en el invernadero.....	27
2.4.5 Medio de cultivo MSA1 para la inducción de bulbillos <i>in vitro</i> .....	29
2.4.6 Evaluación del efecto del origen del material de partida (escamas de bulbos del invernadero o de bulbillos inducidos <i>in vitro</i> ) sobre la inducción de callos 31	
2.4.7 Evaluación del tipo de corte utilizado para obtener los explantes sobre la inducción de callos.....	32
2.4.8 Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de callos.....	36
2.4.9 Evaluación de la fuente de carbono en la inducción de callos.....	39
2.4.10 Registro y evaluación del material vegetal.....	39

2.4.11	Diseño experimental y análisis estadísticos.....	41
2.5	RESULTADOS .....	42
2.5.1	Mejoras en la metodología de desinfección para la obtención de explantes twin-scales y escamas sencillas, a partir de bulbos de plantas desarrolladas en el invernadero.....	42
2.5.2	Inducción de bulbillos a partir de bulbos de plantas cultivadas en el invernadero.....	43
2.5.3	Efecto del origen del material (escamas de bulbos del invernadero o de bulbillos inducidos <i>in vitro</i> ) sobre la inducción de callos .....	43
2.5.4	Efecto del tipo de corte utilizado para generar el explante en la respuesta de las escamas .....	47
2.5.5	Efecto del medio de cultivo sobre la inducción de callos.....	48
2.5.6	Efecto del 2,4-D y cinetina en la inducción de callo embriogénico.....	50
2.5.7	Efecto de la fuente de carbono sobre la inducción de callo. ....	51
2.5.8	Efecto de la edad del explante sobre la inducción de callo. ....	52
2.6	DISCUSIÓN.....	55
2.7	Conclusiones .....	62
2.8	Recomendaciones .....	63
3	Bibliografía.....	65
4	Anexos.....	72

## LISTADO DE TABLAS

<b>Cuadro 1.</b>	Composición de los medios de cultivo MS y MSA1 utilizados para la inducción de bulbillos <i>in vitro</i> y posterior subcultivo.....	31
<b>Cuadro 2.</b>	Experimentos realizados para la evaluación del efecto del origen del material vegetal (bulbos de invernadero o bulbillos <i>in vitro</i> de 21 meses de edad) y el tipo de corte en la inducción de callos. ....	36
<b>Cuadro 3.</b>	Medios MS suplementados con ocho combinaciones de 2,4-D y cinetina, y dos fuentes de carbono, utilizados para evaluar la inducción de callos en <i>Zephyranthes carinata</i> . ....	37
<b>Cuadro 4.</b>	Experimentos realizados para la evaluación del efecto de la composición del medio de cultivo en la inducción de callos utilizando el corte tipo 1.....	38
<b>Cuadro 5.</b>	Tipos de callos inducidos en <i>Zephyranthes carinata</i> a partir de escamas de bulbos de invernadero o bulbillos <i>in vitro</i> .. ....	39

<b>Cuadro 6.</b> Porcentaje de contaminación de twin-scales utilizados para la inducción de bulbillos, a partir de bulbos de <i>Zephyranthes carinata</i> desarrollados en el invernadero.....	42
<b>Cuadro 7.</b> Formación de callos a partir de explantes provenientes de bulbos de invernadero o bulbillos <i>in vitro</i> , después de tres meses de cultivo.....	46
<b>Cuadro 8.</b> Respuesta en la formación de callos a partir de escamas provenientes de bulbos de invernadero o bulbillos <i>in vitro</i> , utilizando el corte tipo 1 y corte tipo 2, después de tres meses de cultivo.....	48
<b>Cuadro 9.</b> Formación de callos totales y embriogénicos en escamas de bulbillos <i>in vitro</i> después de un mes de cultivo en diferentes medios de cultivo.....	50
<b>Cuadro 10.</b> Efecto de la edad del explante en la formación de callo total y embriogénico en escamas de bulbillos <i>in vitro</i> de 3, 21 y 31 meses de edad, después de un mes de cultivo.....	53

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fotografía de planta de Amaryllidaceae mostrando el bulbo y base de las hojas, cultivada en el invernadero de biotecnología vegetal de la Universidad Icesi .....	15
<b>Figura 2.</b> Estructura vegetal del bulbo.....	17
<b>Figura 3.</b> Fotografía de <i>Zephyranthes carinata</i> cultivada en el invernadero de biotecnología vegetal de la Universidad Icesi.....	17
<b>Figura 4.</b> Componentes del medio de cultivo.....	22
<b>Figura 5.</b> Muestra general de las condiciones donde se cultivaron las plantas en el invernadero (A), selección del tipo de bulbos utilizados (B), y manipulación en condiciones de laboratorio (C).....	26
<b>Figura 6.</b> Procesamiento de bulbos de plantas desarrolladas en el invernadero. .	26
<b>Figura 7.</b> Esquema general utilizado para comparar la respuesta en la inducción de callo a partir del material desarrollado en el invernadero o bajo condiciones <i>in vitro</i> . .....	27
<b>Figura 8.</b> Corte de bulbo para obtener twin-scales y su respectiva siembra para inducir la formación de bulbillos <i>in vitro</i> . .....	29
<b>Figura 9.</b> Esquema general del procedimiento utilizado para la evaluación del efecto del origen del material vegetal y el tipo de corte en la inducción de callos. ....	32
<b>Figura 10.</b> Corte Tipo 1 utilizado para la obtención de explantes a partir de escamas sencillas del bulbo y posteriormente inducir formación de callo.....	34
<b>Figura 11.</b> Corte Tipo 2 de bulbo para obtener la inducción de embriogénesis. ...	35
<b>Figura 12.</b> Esquema general del procedimiento utilizado para la evaluación de la combinación y concentración de reguladores de crecimiento y fuente de carbono. ....	37
<b>Figura 13.</b> Formación de callo en la totalidad del explante, con inducción de callo friable tipo 2 (flecha azul) y callo embriogénico (flecha verde), formado a partir de la placa basal (círculo rojo).....	41

<b>Figura 14.</b> Inducción de bulbillos a partir de twin-scales obtenidos de bulbos de plantas cultivadas en el invernadero. (A) Twin-scales después de 2 semanas en cultivo <i>in vitro</i> mostrando coloración verde en la superficie de las escamas. (B) Bulbillos y brotes emergiendo de twin-scales después de 2 meses de cultivo. (C) Bulbillos subcultivados en medio MS para permitir mejor crecimiento y desarrollo de los bulbillos. ....	43
<b>Figura 15.</b> Formación de callo friable y callo embriogénico a partir de escamas de bulbos de invernadero y bulbillos <i>in vitro</i> . ....	44
<b>Figura 16.</b> Callos subcultivados después de 3 meses de inducción en <i>Zephyranthes carinata</i> . ....	45
<b>Figura 17.</b> Porcentaje de explantes con inducción de callo total (A) y callo embriogénico .....	46
<b>Figura 18.</b> Porcentaje de explantes con inducción de callos a partir de explantes con corte Tipo 1 y corte Tipo 2 de escamas de bulbos de invernadero o de bulbillos <i>in vitro</i> después de tres meses de cultivo. ....	48
<b>Figura 19.</b> Porcentaje de explantes con inducción de callo total (A) y embriogénico (B) en diferentes medios de cultivo, a partir de explantes con corte Tipo 1 de escamas de bulbillos <i>in vitro</i> de 3, 21 y 31 meses de edad, después de un mes de cultivo.....	49
<b>Figura 20.</b> Porcentaje de explantes con inducción de callo embriogénico en medios de cultivo con diferentes concentraciones de 2,4-D (A) y cinetina (B) en explantes con corte Tipo 1 de escamas de bulbillos <i>in vitro</i> de 3, 21 y 31 meses de edad después de un mes de cultivo.....	51
<b>Figura 21.</b> Porcentaje de explantes con inducción de callo total (A) y callo embriogénico (B) según la fuente de carbono utilizada, a partir de escamas de bulbillos <i>in vitro</i> de 3, 21 y 31 meses de edad, después de un mes de cultivo.. ....	52
<b>Figura 22.</b> Porcentaje de explantes con inducción de callo total (A), y callo embriogénico (B), a partir de escamas de bulbillos <i>in vitro</i> de 3, 21 y 31 meses de edad. ....	54
<b>Figura 23.</b> Interacción entre el medio de cultivo, la fuente de carbono y la edad de los bulbillos sobre la inducción de callo. (A, C) Inducción de callo total. (A, D) Inducción de callo embriogénico. (A, B) medios con sacarosa como fuente de carbono. (C, D) medios con maltosa como fuente de carbono. ....	54



## RESUMEN

La familia Amaryllidaceae tiene la capacidad de producir una gran diversidad de alcaloides. En varios estudios, se ha encontrado que la mayoría de las especies vegetales de esta familia pueden producir alcaloides con gran potencial farmacológico para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como son el Alzheimer, y diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, su producción es baja lo cual ha sido una limitante para las investigaciones y su uso comercial a gran escala. Dentro de esta familia se encuentra *Zephyranthes carinata*, especie de uso ornamental en Colombia, con amplia distribución en la región andina, no se encuentra amenazada, y se puede adquirir fácilmente por venta comercial en viveros. Estos atributos permiten seleccionarla como especie piloto para el establecimiento de protocolos que luego puedan ser aplicados a otras especies silvestres de la familia. En el presente trabajo se estableció un protocolo de inducción de callo embriogénico en *Zephyranthes carinata*, con el fin de escalar en un futuro la producción de alcaloides en biorreactores. Para ello, se evaluaron los efectos de dos tipos de cortes para generar los explantes, la procedencia del material vegetal de partida (bulbos de invernadero y bulbillos *in vitro*), dos combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento (0,4 o 1,0 mg/L 2,4-D y 0,4 o 1,5 mg/L cinetina), la fuente de carbono (sacarosa y maltosa) y por último, la edad de los bulbillos *in vitro* para obtener los explantes, sobre la inducción de callo embriogénico. Los resultados sugieren un efecto significativo tanto del tipo de corte utilizado como de la edad del bulbillo *in vitro* utilizados para obtener los explantes, en el nivel de inducción de callo embriogénico. La mayor inducción de callo embriogénico se obtuvo con explantes obtenidos a partir de bulbillos de aproximadamente 9 mm de diámetro, inducidos y subcultivados *in vitro*. El corte Tipo 2, para obtener los explantes, indujo la mayor respuesta independientemente del origen del material vegetal, invernadero o *in vitro*. Finalmente, la mayor inducción de callo embriogénico se obtuvo en el medio que contenía 2,4-D 1,0 mg/L y cinetina 0,4 mg/L, suplementado con sacarosa al 3%. Es importante seguir optimizando el protocolo para la proliferación de callo embriogénico en *Zephyranthes carinata*. Esto permitirá en un futuro, el cultivo de estos tejidos en biorreactores para la producción de alcaloides a gran escala. Además de permitir la multiplicación y conservación de amarillidáceas en condiciones *in vitro*, tanto por medio de regeneración de plantas vía embriogénesis, como la producción de semillas artificiales para la conservación a largo plazo en criopreservación.

**Palabras claves:** Amaryllidaceae, *Zephyranthes carinata*, embriogénesis somática, alcaloides y callo embriogénico

## ABSTRACT

The family Amaryllidaceae produces a wide variety of alkaloids. Several studies have found that most of these plant species can produce alkaloids with great pharmacological potential, including the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, and different types of cancer. However, the alkaloid production in the plants is low, which is a limitation for research and commercial use at a large scale. *Zephyranthes carinata* is an Amaryllidaceae species of ornamental use in Colombia, with wide distribution in the Andean region, it is not threatened, and can easily be acquired commercially. These attributes allow to select it as a pilot species for the establishment of protocols that can then be applied to other wild species of the family. In the present work, an embryogenic callus induction protocol was established for *Zephyranthes carinata*, as a first step to scale up in the future the production of alkaloids in bioreactors. In this project, various factors affecting the *in vitro* response were evaluated on the induction of embryogenic callus. These factors included the evaluation of two types of excisions to generate the explants, the origin of the starting plant material (greenhouse bulbs or *in vitro* bulblets), two combinations and concentrations of growth regulators (2,4-D at 0.4 mg/L or 1.0 mg / L, and kinetin at 0.4 mg/L or 1.5 mg / L), two carbon sources (sucrose or maltose), and finally, the age of the *in vitro* bulblets used as a source to obtain the explants. Results suggest a significant effect of the induction of embryogenic callus by the type of excision used to generate the explants and by the age of the *in vitro* bulblets. The highest induction of embryogenic callus was obtained when using bulblets of about 9 mm in diameter from *in vitro* young plants (about 3 month old). In addition, excision Type 2 to generate the explants induces the highest response independently of the source of the plant material used. Finally, explants should be cultured on medium containing 1.0 mg / L 2,4-D, 0.4 mg / L kinetin and supplemented with 3% sucrose. Results presented herein are promising. However, there is still a need to optimize further the induction and proliferation of embryogenic callus in *Zephyranthes carinata* to a level that would allow in the future, its use in bioreactors for the large-scale production of alkaloids. In addition, for the multiplication and conservation of Amaryllidaceae under *in vitro* conditions, both through regeneration of plants via embryogenesis, and the production of artificial seeds for the long-term conservation in cryopreservation.

**Key words:** Amaryllidaceae, *Zephyranthes carinata*, somatic embryogenesis, alkaloids and embryogenic callus

# 1 INTRODUCCIÓN

Dentro de la familia Amaryllidaceae, el género *Zephyranthes* es conocido comúnmente como “lirios de lluvia” ya que su floración ocurre después de largos períodos de lluvia (Knox, 2009). Los lirios de lluvia ocupan un amplio nicho ecológico, desde condiciones áridas hasta temporalmente inundadas, y tienen muchas características ornamentales codiciadas (Knox, 2009). Varias especies de Amaryllidaceae son estériles, por lo que la reproducción vegetativa (asexual) a través de bulbos es la única alternativa reproductiva que posee (Bedoya & Ríos, 2010). Además de ser plantas ornamentales, las amarillidáceas producen alcaloides farmacológicamente activos, como la galantamina la cual es usada en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer como inhibidor de la colinesterasa (López, 2002). Desde el aislamiento del primer alcaloide, licorina, a partir de *Narcissus pseudonarcissus* en 1877, se han producido considerables progresos en el estudio de las plantas de Amaryllidaceae.

Infortunadamente, la baja producción de estos alcaloides *in planta* ha sido una limitante importante para el progreso de las investigaciones y sus posibles usos (Selles, Viladomat, Bastida, & Codina, 1999). Adicionalmente, varias de estas especies se encuentran amenazadas o en vía de extinción y presentan dificultades asociadas a su reproducción (Ramos, 2001), por lo que es necesario evaluar formas alternativas de aumentar la obtención de estos compuestos. Una alternativa es utilizar cultivo *in vitro* ya que se pueden obtener sustancias de gran utilidad (metabolitos secundarios) en condiciones controladas. Las condiciones ambientales tales como temperatura, humedad relativa, radiación solar, fotoperiodo, disponibilidad de agua y nutrientes, entre otras, pueden influir sobre el desarrollo de las plantas y así mismo en la producción de sus metabolitos secundarios como los alcaloides, los cuales se generan mayormente en situaciones de estrés (Taiz & Zeiger, 2006). Aunque las condiciones *in vitro* permiten el control de estas variables ambientales y de la nutrición de las plantas, el proceso *in vitro* es un estrés (El Tahchy et al., 2011) que podría favorecer la producción de alcaloides o facilitar la optimización de las condiciones (Tofiño, 2017). Además, es posible incrementar la productividad mediante el control automatizado del proceso. Este proyecto forma parte de un estudio que busca establecer un protocolo *in vitro* para obtener en un futuro una mayor producción de estos alcaloides, y poder generarlos a gran escala como en el uso de biorreactores.

Colombia es uno de los dos países con mayor biodiversidad del mundo. Colombia alberga el 10% del total de la fauna y flora del mundo, sin embargo, ocupa la posición número 27 entre los 40 países que menos invierten en biodiversidad (Rangel-Ch, 2015). Por lo que es necesario contribuir al conocimiento de sus especies nativas y aportar desde nuestras bases al desarrollo científico de nuestro país. Con base en diecinueve años de investigación, la Universidad del Valle ha presentado información sobre la fenología, ecología de polinización, supervivencia,

dispersión, y posible pérdida de dispersores de algunas de las especies pertenecientes a la familia Amaryllidaceae del departamento del Valle del Cauca (Silverstone-Sopkin, 2011). Actualmente, estudios realizados por el Grupo de Investigación en Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi ha centrado su atención en la caracterización, conservación y futuro uso sustentable de especies amarillidáceas nativas de Colombia. Para lo cual debe generar nuevo conocimiento de estas especies, las cuales han sido poco estudiadas. Entre los proyectos de investigación está el uso de la técnica de cultivo de tejidos para desarrollar protocolos de propagación que permitan la producción de alcaloides encontrados en *Zephyranthes carinata*, protocolos que luego podrán ser adaptados y optimizados para aplicarlos a otras especies silvestres. En el caso de la amarillidáceas, hasta ahora, se han aislado aproximadamente unos 300 alcaloides (Acosta León, 2013; Bastida et al, 2006) y, aunque sus estructuras varían considerablemente entre sí, se considera que estos alcaloides poseen diversas propiedades terapéuticas, fungicidas, bactericidas, antivirales, antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas (García, 2008). En los trabajos realizados en la Universidad Icesi, Tofiño (2017) y Alizandre (2017) detectaron los alcaloides licorina, licoramina, hemantamina, vitattina, hamayna, ambellina, zaideina, y 9 alcaloides desconocidos. En tejidos como hojas y bulbillos *in vitro*, se detectaron 14 alcaloides, y en callos embriogénicos y friables 2 alcaloides, para un total de 16 alcaloides (Alizandre, 2017; Tofiño, 2017). Desde esta perspectiva, este trabajo tiene como propósito establecer un protocolo para la inducción y producción de callo embriogénico en la especie *Zephyranthes carinata*, con el fin de escalar a futuro su producción en sistemas de inmersión temporal o biorreactores para incrementar la producción de alcaloides a partir de estos tejidos. Los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) abren la posibilidad de semi-automatizar algunas etapas del cultivo *in vitro* (Alvard et al., 1993), permiten mayor facilidad de escalado y aumentan la eficiencia biológica y productiva del material propagado (Jiménez et al., 1999; Castro, 2001). De esta forma, el cultivo en Inmersión Temporal puede constituir una alternativa para incrementar la producción de alcaloides a partir de callos embriogénicos (Escalona et al., 1999).

En este estudio se evalúan las respuestas de los tejidos a partir de material vegetal propagado en condiciones de invernadero, y del material obtenido y subcultivado bajo condiciones *in vitro*, con el fin de establecer cuál induce mayor generación de callo embriogénico. De igual manera, se evalúa, por primera vez, la influencia del tipo de corte para generar los explantes a partir de las escamas de bulbos del invernadero o bulbillos *in vitro*, con el fin de optimizar el desarrollo del callo embriogénico. Finalmente, se evalúa el efecto de la combinación y la concentración de reguladores de crecimiento, dos fuentes de carbono, y la edad de los tejidos para la inducción y producción de callo embriogénico en la especie *Zephyranthes carinata*.

Los resultados obtenidos en esta investigación permitirán, en primer lugar, entender mejor los parámetros que afectan la embriogénesis somática en *Zephyranthes carinata* con el objetivo de optimizar la producción de embriones somáticos a gran escala para la producción de alcaloides. Por último, que el aprendizaje y nuevo conocimiento generado con esta especie, pueda en un futuro ser aplicado a otras especies silvestres nativas de las regiones poco estudiadas y que se encuentran amenazadas. De esta manera, la embriogénesis somática, además de ser una alternativa para optimizar la producción de alcaloides, puede ser utilizada para la multiplicación y conservación *in vitro* de amarilidáceas, sin afectar la distribución en ambientes naturales. Hasta el momento no se ha reportado un protocolo para la inducción de callo embriogénico en *Z. carinata*. De allí la importancia de este estudio, como inicio a una evaluación integral de los principales factores que afectan generalmente la embriogénesis somática.

## 2 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

### 2.1 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN

Entre las especies que han sido estudiadas ampliamente por la importancia de sus alcaloides se encuentran aquellas pertenecientes a la familia Amaryllidaceae. Esta familia además de tener valor ornamental, se destaca por la producción de la galantamina, un inhibidor de la acetilcolinesterasa aprobado para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, entre otros alcaloides con actividad farmacológica de interés terapéutico (Cahlíková et al., 2011; Singh B & Katoch D, 2015).

Infortunadamente, estos metabolitos secundarios se producen típicamente a bajas concentraciones en tejidos específicos de las plantas a través de rutas metabólicas complejas. Dada la escasa disponibilidad de muchos metabolitos y debido a la importancia que estos tienen, el Grupo de Investigación en Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi ha establecido entre sus líneas de investigación, una orientada a incrementar la producción de alcaloides en *Zephyranthes carinata*. Esto se llevó a cabo a partir del desarrollo y la optimización de dos rutas de cultivo *in vitro*, organogénesis y embriogénesis, para comparar cuál de las dos vías de cultivo de tejido *in vitro* genera mayor producción de alcaloides. Un estudio anterior del grupo, concluye que es necesario evaluar diferentes reguladores de crecimiento y componentes en el medio de cultivo para incrementar la proliferación de callos embriogénicos en forma estable, por medio de embriogénesis somática, que podrán ser utilizados posteriormente como biofábricas para incrementar la producción de alcaloides a partir de estos tejidos en biorreactores (Tofiño, 2017).

En Colombia, a pesar de que la especie *Zephyranthes carinata* es nativa y cultivada ampliamente en los viveros como planta ornamental, son escasos los estudios relacionados a la producción sustentable de metabolitos secundarios a partir de esta especie en condiciones *in vitro*. En este contexto, conociendo las ventajas de la embriogénesis somática para el escalamiento de la producción de metabolitos secundarios, y teniendo en cuenta la importancia de la especie desde el punto de vista farmacológico, el presente trabajo tiene como finalidad aumentar la cantidad y calidad de la producción de callo embriogénico *in vitro* de esta especie, que permita la extracción de alcaloides. Para ello se evaluará el efecto de diferentes reguladores de crecimiento y fuentes de carbono en la producción de callos embriogénicos, obtenidos a partir de bulbillos sub-cultivados *in vitro* y de bulbos de invernadero, con el fin de identificar la mejor fuente del material vegetal de partida. Así mismo se busca identificar las mejores condiciones para la producción masiva de embriones somáticos adecuados para en un futuro escalar su producción en sistemas de inmersión temporal o biorreactores, conjuntamente con tratamientos de inductores químicos que estimulan la producción y liberación de alcaloides al medio líquido, lo que facilitaría su extracción.

## 2.2 MARCO TEÓRICO

### 2.2.1 Familia Amaryllidaceae

La familia Amaryllidaceae pertenece a un grupo de plantas herbáceas perennes, raramente acuáticas o epifitas (Meerow et al., 1998; Silverstone-Sopkin, 2011). Se caracterizan morfológicamente por tener un bulbo subterráneo grueso cubierto por bases membranosas de la hoja llamada túnica (Wanderley et al., 2005) (**Figura 1**). Adicionalmente, presentan hojas simples, indivisas, dísticas generalmente sésiles y lineales en forma lanceolada hasta ampliamente elíptica de forma cóncava. Las raíces son adventicias y se originan de la placa basal del bulbo (Meerow et al., 1999; López & Espejo, 2002). La inflorescencia es terminal y las flores a menudo son grandes y llamativas.



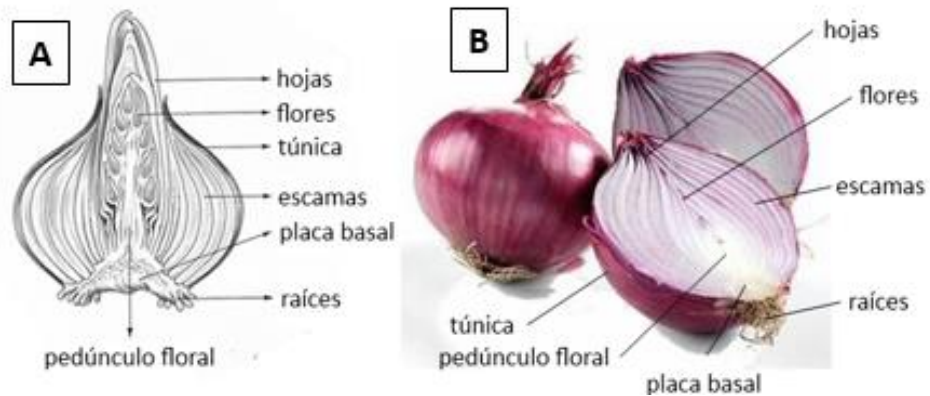
**Figura 1.** Fotografía de planta de Amaryllidaceae mostrando el bulbo y base de las hojas, cultivada en el invernadero de biotecnología vegetal de la Universidad Icesi

Su distribución geográfica es cosmopolita, predominantemente en las regiones tropicales y subtropicales, siendo América del Sur y Sudáfrica sus principales centros de diversidad (Simpson, 2010). Puede ocupar hábitats diferentes como lugares estacionalmente secos, el sotobosque de las selvas tropicales y las riveras de los ríos (Snijman, 2004). Su importancia económica es principalmente como plantas ornamentales cultivadas, debido a la diversidad de formas y colores atrayentes de sus flores (Wanderley et al., 2005). También son utilizadas por los

pueblos indígenas para fines medicinales, aromatizantes, psicotrópicos u otros; ya que se caracterizan por la producción de una serie de alcaloides únicos. Éstos han sido estudiados principalmente como inhibidores enzimáticos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, lo cual hace que esta familia sea de gran interés químico y farmacológico (Simpson, 2010). Las especies nativas de Colombia han sido de las menos estudiadas, sin embargo el perfil de la diversidad de alcaloides encontrado a la fecha sugiere otras posibles aplicaciones como agentes anticancerígenos (Edison Osorio, Sede de Investigación Universitaria, SIU, Universidad de Antioquia, Medellín, comunicación personal).

En las plantas se conocen dos tipos de reproducción, la sexual y la asexual. En la reproducción sexual se producen células especializadas conocidas como gametas, que se caracterizan por presentar la mitad de los cromosomas de la especie. Las gametas femeninas y masculinas de diferentes organismos se recombinan para formar un cigoto, el cual se diferencia dando origen al nuevo individuo. En la reproducción sexual se da la recombinación genética, fuente de variabilidad en la población; además, esta estrategia reproductiva le permite a la especie tener una mayor dispersión en el ambiente a través de las semillas, lo que se traduce en la posibilidad de que los descendientes se establezcan y conquisten nuevos ambientes. En la reproducción asexual, se producen organismos totalmente idénticos a la planta madre, dado que el proceso de multiplicación es a partir de la división mitótica de tejidos preexistentes, que se diferencian en un nuevo individuo con copias genéticas exactas al organismo original (Simpson, 2010). Las amarilidáceas se reproducen asexualmente por propagación vegetativa, a través del bulbo, órgano engrosado subterráneo de almacenamiento de nutrientes. El bulbo está formado por el engrosamiento de la base de las hojas; el disco basal, que es la parte inferior del bulbo donde crecen las raíces; los catáfilos o escamas carnosas que funcionan como órganos de reserva; el vástago formado por la yema floral y otras yemas en desarrollo; y las yemas laterales localizadas entre las escamas cerca de la placa basal, la cual da origen a nuevos bulbos denominados bulbillos (**Figura 2A**) (Rojas González et al, 2004). Los bulbos también son utilizados frecuentemente como alimento, por ejemplo en el caso de cebollas y ajos (**Figura 2B**).





**Figura 2. Estructura vegetal del bulbo.**

### 2.2.2 Género *Zephyranthes*

Las plantas del género *Zephyranthes* son conocidas tradicionalmente como "lirios de la lluvia", debido a su tendencia a florecer poco después de los períodos de lluvia (Singh B, 2015). Generalmente, son de fácil cuidado y amplia adaptabilidad, lo que los hacen ideales como objeto de estudio. En el Valle del Cauca, la especie *Zephyranthes carinata* es de fácil acceso en los viveros por su uso ornamental y es multiplicada bajo condiciones de invernadero en la Universidad Icesi (**Figura 3**), por lo que facilita su acceso para estudios de cultivo *in vitro* establecidos por el Grupo de Investigación en Biotecnología Vegetal. La intención es que el aprendizaje y nuevo conocimiento generado sobre esta especie, pueda en un futuro ser aplicado a especies silvestres nativas de la región.



**Figura 3.** Fotografía de *Zephyranthes carinata* cultivada en el invernadero de biotecnología vegetal de la Universidad Icesi.

### 2.2.3 Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales consiste en tomar una porción de una planta (a la que se denominará explante); ya sean embriones cigóticos, segmentos de tallo, semillas, brotes, entre otros y cultivarlos en un medio nutritivo y en condiciones asépticas controladas donde se regenerarán muchos individuos viables, para obtener finalmente la micropropagación del organismo de interés (Ochoa-Villareal et al., 2015). En este caso, la especie *Zephyranthes carinata* no se encuentra amenazada, por lo que permite seleccionarla como especie piloto para el establecimiento de protocolos que luego puedan ser aplicados a otras especies de la familia por medio del cultivo *in vitro* como una alternativa para el uso sostenible de estas plantas.

La micropropagación tiene un amplio uso comercial debido a que posee varias ventajas; como se realiza en un laboratorio bajo condiciones controladas, no depende de condiciones ambientales y a su vez se utiliza un espacio reducido con el potencial de generar muchas plantas en un corto tiempo (Tofiño, 2017). Además de la micropropagación, las técnicas *in vitro* permiten estudiar una serie de procesos con posibles aplicaciones para la investigación científica como la conservación de germoplasma, la obtención de metabolitos secundarios, el mejoramiento genético de plantas, entre otros. Niño (2010) recurrió al cultivo *in vitro* para lograr una mayor tasa de multiplicación de la especie *Crinum x powelli* puesto que es un híbrido estéril y, por ende, su propagación es baja. Debido a las desventajas que existe para regenerar tejidos por otras vías como la organogénesis, él propone la embriogénesis somática como método viable y eficiente para la multiplicación vegetativa de especies promisorias.

Existen varias técnicas de propagación, entre las cuales se encuentra la técnica de twin-scale. Su propósito es la separación de dos escamas adyacentes unidas en la base por la placa basal en plantas bulbosas (Barnhoorn, 2005). Los bulbos son órganos subterráneos que tienen como función principal el almacenamiento de nutrientes para asegurar la supervivencia de la planta, y son utilizados para la técnica de twin scale porque su placa basal presenta células meristemáticas o totipotentes (Nordstrom et al., 2004). De esta manera, las twin-scales puede ser utilizadas para inducir bulbillos *in vitro*, y las escamas sencillas para inducir la formación de callos a partir de embriogénesis somática (Chamorro, 2016; Alizandre, 2017; Tofiño, 2017).

La embriogénesis somática puede mejorar en gran medida la tasa de multiplicación de las plantas bulbosas *in vitro*. No existen dudas que en todo intento de propagación vegetal, ya sea *in vitro* o *in vivo*, el carácter del proceso de diferenciación depende del genoma de la especie, y que está regulado por el balance hormonal propio y por el estado fisiológico del órgano, tejido o célula puesta en cultivo. Sin embargo, también se sabe que ese balance puede ser modificado

por el agregado de compuestos que imiten la acción de las hormonas vegetales. Estos compuestos se denominan reguladores del crecimiento, y se emplean en los medios de cultivo para lograr la propagación de una planta (Segretín, 2006).

#### **2.2.4 Embriogénesis somática**

Es una técnica biotecnológica de propagación de plantas que permite obtener embriones a partir de células somáticas desde cualquier tipo de tejido vegetal, sin la necesidad de la fusión de gametos (Bedoya & Rios, 2010; Tisserat et al., 1979). Este método, teóricamente, es el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro* debido a la naturaleza bipolar del embrión, sus altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo y la posibilidad de automatizar el proceso productivo con el uso de biorreactores (de Feria, 2000). Sin embargo, sus desventajas radican en el desconocimiento que existe sobre la biología del proceso de embriogénesis somática, aunado a la no disponibilidad de sistemas eficientes y repetibles de regeneración (Freire-Seijo, 2003).

#### **2.2.5 Embriogénesis somática en Amaryllidaceae**

La embriogénesis somática de diferentes especies pertenecientes a esta familia ha sido estudiado ampliamente a nivel mundial (Ptak et al., 2013 ;Selles & Codina, 1999; Saghi et., al 2007; Sage et al., 2005; Ptak et al., 2010; Mujib et al., 2013; Niño et al., 2010; Sage & Hammatt et al., 2005; Bedoya & Ríos., 2010; Alizandre, 2017), sin embargo son pocos los estudiados enfocados a la especie *Zephyranthes carinata* (Tofiño, 2017). Dado su potencial uso en el desarrollo de productos farmacéuticos, es necesario emplear la embriogénesis somática para aumentar la producción de alcaloides por medio de callos embriogénicos, lo cual permitirá hacer uso a nivel industrial sin afectar directamente las poblaciones silvestres. Un estudio preliminar realizado en el Grupo de Investigación en Biotecnología de la Universidad Icesi, sugiere que es posible inducir embriones somáticos en esta especie (Tofiño, 2017), pero se requiere optimizar el proceso.

Los aspectos que más influyen sobre la embriogénesis somática en especies vegetales, en orden de importancia son: los reguladores de crecimiento, el tipo de explante, el genotipo, el estado de desarrollo del explante, el medio de cultivo y el tamaño del explante (Badawy et al., 2005; Asemota et al., 2007; Steinmacher et al., 2007a; Gueye et al., 2009; Perera et al., 2009). A continuación se presentará información relevante de los efectos que ejercen algunos componentes claves en un medio de cultivo *in vitro*.

Al igual que en muchas otras familias, en Amaryllidaceae existen distintos tipos de callos creciendo sobre la superficie del explante durante la etapa de inducción vía embriogénesis somática. Los callos embriogénicos se agrupan variando en tamaño

y número y su desarrollo no está sincronizado. Se caracteriza porque sus células son poco voluminosas, tienen gran cantidad de ribosomas, compuestas por un citoplasma muy pequeño, un nucléolo agrandado, con alto contenido de almidón y lípidos (Bedoya & Rios, 2010). Estas células son capaces de dividirse o de transformarse en embriones somáticos según las condiciones del medio de cultivo. Un callo embriogénico puede ser compacto, organizado, generalmente de color amarillo y de crecimiento lento (Yeung, 1995). Los embriones somáticos son estructuras bipolares con un eje radical-apical (raíz y brote); los cuales se constituyen en nuevos individuos capaces de originar una planta completa (Bedoya & Rios, 2010).

## **2.2.6 Factores que afectan la embriogénesis somática**

### **2.2.6.1 Desinfección del material vegetal**

El procedimiento de desinfección superficial del material vegetal colectado en campo debe eliminar los microorganismos pero a la vez debe causar el menor daño posible al explante (Abdelnour, 1994). Varios compuestos se han recomendado y entre los más usados están el hipoclorito de sodio (cloro comercial del 2% al 5%) y el etanol al 70% (Bedoya & Rios, 2010). También se ha recomendado la adición de un detergente, como el Tween-20, para romper la tensión superficial y permitir que el explante esté en mejor contacto con el químico (Abdelnour, 1994). No se puede generalizar sobre el tipo de desinfectante o la concentración de éste ya que cada especie y tipo de explante es diferente. Sin embargo, la desinfección de los explantes dependerá del tipo y origen del material vegetal utilizado y entre más pequeño sea el explante a introducir a cultivo *in vitro* menor será la contaminación. Adicionalmente, el tamaño debe ser tal que facilite el establecimiento del tejido. En el caso de las especies bulbosas de la familia Amaryllidaceae, es necesaria la implementación de un protocolo de desinfección efectivo debido a la presencia de mucílago y bacterias en el interior de los mismos. El bactericida fungicida TEGO 51 es implementado en muchos protocolos de desinfección vegetal porque tiene un efecto comprobado contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos y levaduras encontradas en la profundidad de los tejidos (Aldana & Sarassa, 1999). Mientras que el hipoclorito de sodio es un potente germicida con actividad de amplio espectro, sin embargo, solo afecta a bacterias Gram positivas y Gram negativas no formadoras de esporas.

### **2.2.6.2 Tipo de explante**

En base a la definición de totipotencia, todos los tejidos vegetales tienen la capacidad para formar embriones somáticos *in vitro* (Abdelnour, 1994). Sin embargo, dependiendo de las especies y de las condiciones de cultivo, existen tejidos que responden mejor a los tratamientos para la inducción de embriogénesis

somática que otros. Para lograr la regeneración de embriones somáticos en plantas monocotiledóneas es muy importante la selección de explantes que contengan regiones meristemáticas (Benson, 2000). En general, se tiende a utilizar material procedente de plantas jóvenes debido a su alta capacidad regenerativa y poco diferenciada (Pérez, 1998); de manera que es más fácil desviarlo de su programa genético y así obtener la dediferenciación hacia la formación de embriogénesis somática (Abdelnour, 1994). Es por ello, que en especies bulbosas comúnmente se utilizan escamas localizadas en la parte intermedia (Niño, 2010; Bedoya & Rios, 2010; Tofiño, 2017).

Según Litz, 1984 y Dhed'a et al, 1991, un factor a considerar es que muchas veces dentro de una especie, las reacciones de las diferentes variedades pueden ser muy diferentes. Así, un método establecido para una especie podrá no aplicarse a otro individuo de la misma especie. De esta manera, el estado de desarrollo de la planta madre, el tamaño, los cortes que sufre el explante y la edad fisiológica son de gran influencia para el éxito de dicho cultivo.

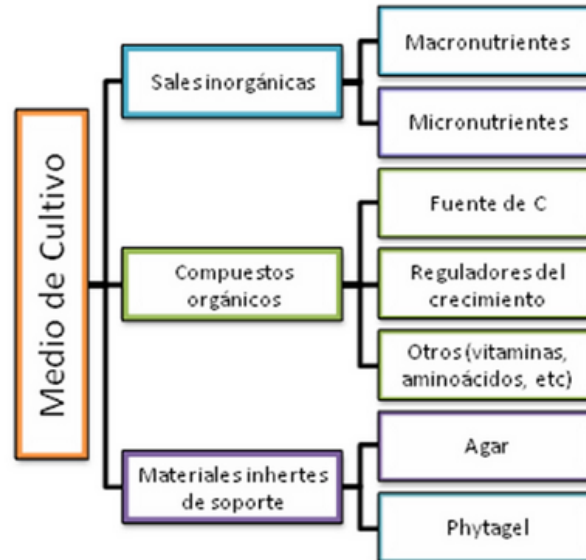
El tamaño del explante es otro de los factores que puede afectar la respuesta embriogénica. En general, los tamaños más pequeños responden mejor ante los diferentes tratamientos, probablemente porque existe una mayor cantidad de células expuestas al medio de cultivo, lo cual provoca un mayor estrés que fomenta el metabolismo celular (Fehér *et al.* 2003). Sin embargo, esto no siempre se aplica ya que en el caso particular del cultivo de tejidos *in vitro*, los cortes que sufre el explante o incluso el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante ocasionan procesos de oxidación en el tejido. El seccionamiento de los explantes hasta alcanzar tamaños pequeños, permitiría que una mayor cantidad de células perivasculares se encuentren en contacto con los componentes del medio de cultivo y, por tanto, respondan con mayor facilidad.

### **2.2.6.3 Origen del material en la embriogénesis somática**

Por otro lado, hay reportes que demuestran que cualquier cultivo *in vitro* puede alcanzar producciones tan altas o más de un determinado compuesto respecto a las que presenta una planta desarrollada en condiciones silvestres, sin importar de qué parte de la planta se haya establecido el cultivo (Rivas-Morales, 2016). Así, las condiciones fisicoquímicas y nutricionales actúan sobre los cultivos para orientar la expresión genética de las células a diversos grados de diferenciación que proporciona a los cultivos características propias y únicas.

#### 2.2.6.4 Medios de cultivo

Los medios de cultivo vegetales contienen todos los nutrientes requeridos para el crecimiento normal y el desarrollo de las plantas. Estos están compuestos principalmente de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, otros compuestos orgánicos, reguladores de crecimiento, fuente de carbono y algunos agentes solidificantes, en el caso de los medios de cultivo sólidos (**Figura 4**).



**Figura 4.** Componentes del medio de cultivo.

(Rivas-Morales et al., 2016)

Los reguladores de crecimiento (fitohormonas) desempeñan un papel esencial en la determinación de las rutas de desarrollo de las células vegetales durante el cultivo *in vitro*. El tipo y concentración de fitohormonas a utilizar depende de la especie con la que se esté trabajando, el tejido u órgano a cultivar y los objetivos del experimento.

Las citoquininas y las auxinas en cultivo de tejidos se adicionan con frecuencia para lograr un crecimiento cuantitativo (aumento del número de células y volumen). Las auxinas sólo se requieren durante las fases iniciales de la embriogénesis somática. Después de eso, se vuelven inhibidores y bloquean la proliferación de embriones (Rivas-Morales, 2016). Tanto en Amaryllidaceae como en otras familias de plantas, las auxinas son los reguladores de crecimiento más ampliamente utilizados para inducir callo con potencial embriogénico. De las auxinas disponibles, la más utilizada para la etapa de inducción es el 2,4-D (Mujib et al., 2013; Selles & Codina, 1999; Bedoya & Rios, 2010; Ptak et al., 2010; Tofiño, 2017; Saghi et., al 2007) como una auxina fuerte, pero esto sólo se aplica a la formación de callos y embriones

somáticos. Las citoquininas promueven la división celular; la adición de citoquininas es usualmente requerida para obtener crecimiento de callo. La mayoría de autores enfocados han utilizado citoquininas como la kinetina (Bedoya & Rios, 2010; Tofiño, 2017) para trabajos relacionados a embriogénesis somática con especies bulbosas.

En todas las familias de plantas, incluyendo la Amaryllidaceae, el aspecto más importante durante el cultivo *in vitro* es la selección adecuada de los reguladores de crecimiento que se incorporan en el medio de cultivo (Benson, 2000). Al respecto, es muy importante tener en cuenta que los explantes se encuentran bajo el control de reguladores de crecimiento tanto endógenos como exógenos y que el balance de estos es el que determina el resultado final (Jiménez, 2005). Por ejemplo, Bedoya & Rios (2010) obtuvieron mayor tasa de crecimiento y posterior formación de embriones somáticos en el medio Murashige y Skoog (MS) (1962) suplementado ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en combinación con diferentes concentraciones de kinetina. De igual manera, Tofiño (2017) obtuvo callos embriogénicos en el laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad Icesi por medio de una modificación del medio utilizado para la especie *Crinum x powellii* (Bedoya & Rios, 2010).

En síntesis, las combinaciones con diferentes concentraciones de 2,4-D y kinetina se ven directamente relacionadas con la inducción y producción de callo embriogénico en diferentes géneros de la familia Amaryllidaceae. Por este motivo, se han realizado diversos ensayos en el Grupo de Biotecnología Vegetal involucrando medios de cultivos con estos reguladores de crecimiento a diferentes rangos de concentraciones, obteniendo así resultados novedosos.

#### **2.2.6.5 Efecto de la fuente de carbono en la embriogénesis somática**

Según los protocolos de embriogénesis somática, se necesita una fuente de carbono para proporcionar la energía necesaria para el proceso. La sacarosa es el carbohidrato más utilizado para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, se considera generalmente como el carbohidrato estándar de los medios de cultivo (Evans et al., 1981, Dunwell, 1985, Strickland et al., 1987, Scott y Lyne, 1994). Sin embargo, se ha reportado que existen otras fuentes de carbono eficaces para la embriogénesis somática en plantas (Brown et al., 1995). A diferencia de la sacarosa, la maltosa es hidrolizada lentamente durante el cultivo *in vitro*, por tanto durante los primeros 21 días, el azúcar predominantemente en el medio sigue siendo la maltosa, manteniendo más estable el potencial osmótico del medio, antes que los subproductos derivados de la hidrólisis (Roberts, O. Dunwell, J.M. 1990). En el caso de las Amaryllidaceae, no existe documentación donde reporten el uso de maltosa como fuente de carbono para inducir embriogénesis somática. Sin embargo, se ha demostrado la eficacia de la maltosa como fuente de carbono para la embriogénesis

somática en otras especies como petunia (Raquin, 1983), alfalfa (Strickland et al., 1987), pino (Nagmani et al., 1993), guisante (Loiseau et al, 1995) y manzana (Daigny et al., 1996). Por ejemplo, se ha demostrado la eficacia de la maltosa como fuente de carbono para la embriogénesis somática en petunia (Raquin, 1983), alfalfa (Strickland et al., 1987), pino (Nagmani et al., 1993), guisante (Loiseau et al , 1995) y manzana (Daigny et al., 1996). Además, la maltosa se ha utilizado para mejorar la maduración del embrión somático en el cacao (López-Baez et al., 1993) y el pino (Li et al., 1998).

## **2.3 OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Establecer un protocolo para la inducción y producción de callo embriogénico de la especie *Zephyranthes carinata*

### **Objetivos específicos**

- Determinar el tipo de corte y explante para optimizar el desarrollo de callo embriogénico a partir de bulbillos sub-cultivados *in vitro* y bulbos de invernadero bajo condiciones *in vitro*.
- Comparar y seleccionar la procedencia del material de partida, bulbillos subcultivados *in vitro* o bulbos de invernadero, para la generación de callo embriogénico
- Determinar la concentración, la mejor combinación de reguladores de crecimiento, y la fuente de carbono, para la inducción y producción de callo embriogénico en la especie *Zephyranthes carinata*.

## **2.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.4.1 Material vegetal de partida recolectado del invernadero**

La Universidad Icesi cuenta con una colección de plantas de *Zephyranthes carinata*, la cual se encuentra ubicada en el invernadero de la Universidad y es mantenida



por el grupo de investigación de biotecnología vegetal. El invernadero estuvo cubierto con poli-sombra negra (Figura 4A), a fin de reducir los niveles de radiación para un mejor desarrollo y crecimiento de estas especies de plantas adaptadas a condiciones de sotobosque. Se sembraron en potes de 3 kg con tierra fertilizada y se regaron con agua dos veces por semana, la temperatura varió entre 19.6°C y 30.0°C en los meses febrero, marzo y abril, tiempo en el que se recolectó el material vegetal.

#### 2.4.2 Protocolo de desinfección del material vegetal

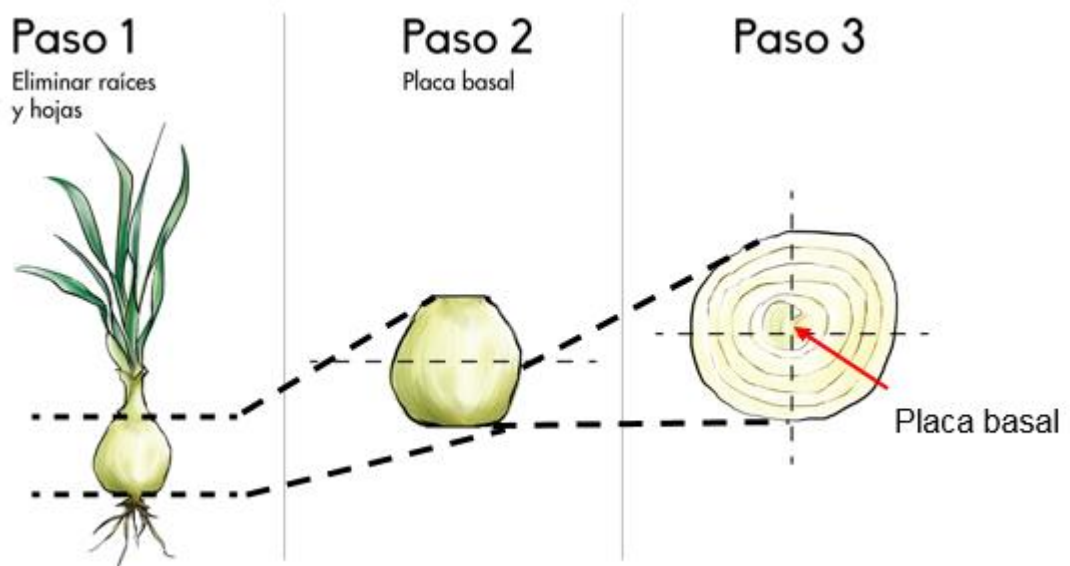
Se seleccionaron bulbos de invernadero (Figura 5A) cuyo tamaño oscilaba entre 14 y 20 mm de diámetro (Figura 5B) y que no presentaran inflorescencia, dado que los bulbos de plantas con flores tienen una baja respuesta *in vitro* y sólo producen flores en lugar de inducir bulbillos. Cada bulbo de *Zephyranthes carinata* que se recolectó del material de invernadero se sometió a un proceso de desinfección superficial en dos secciones:

1. En el cuarto de lavado:
  - a) Se retiraron las raíces, hojas y escamas exteriores o túnicas del bulbo (Figura 5, Paso 1).
  - b) Se lavaron manualmente los bulbos con detergente Extran® al 50% y abundante agua corriente para retirar residuos del suelo.
  - c) Por cada 3 bulbos se prepararon 200 mL de una solución de fungicida y bactericida MERCK TEGO 51 (Dodecil Dietilen Diaminoglicina y Dodecilano Propilglicina 9.0%, Excipientes C.S.P.100%) al 2%, se sumergieron los bulbos durante 5 minutos, y se enjuagaron con abundante agua corriente para garantizar la eliminación de agentes microbianos.
2. En la cabina de flujo laminar:
  - a) Los bulbos se transfirieron a etanol al 70% por 1 minuto en agitación constante.
  - b) Se enjuagaron 3 veces con agua desionizada estéril
  - c) Se cortó el bulbo a la mitad de tal manera para descartar la parte apical (**Figura 6**, paso 2) y luego cortar la parte basal longitudinalmente en 4 secciones iguales incluyendo placa basal (**Figura 6**, paso 3).
  - d) Luego de realizar el corte de los bulbos se prosiguió a enjuagar con agua desionizada estéril con el fin de retirar el mucilago producido.
  - e) Los bulbos cortados se introdujeron en etanol al 70% por 1 minuto en agitación constante, realizando un enjuague con agua desionizada estéril.
  - f) Se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 1,5% con 4 gotas de Tween 20 por cada 100 mL de solución durante 20 minutos con agitación constante.
  - g) Se realizaron tres lavados con agua desionizada estéril por 3 minutos, luego 10, y por último 15 minutos con el propósito de remover en cada lavado el

hipoclorito en exceso. Una vez realizados los tres lavados, los bulbos quedan listos para la obtención de explantes para el cultivo *in vitro*. Para facilitar el aislamiento de cada tipo de explante, los cortes del material se realiza en un estereoscopio (Marca Nikon, modelo SMZ 445 C-LEDS (**Figura 5C**).



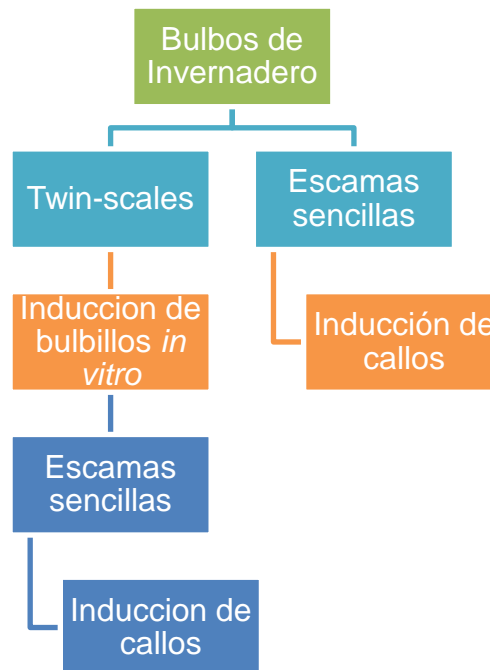
**Figura 5.** Muestra general de las condiciones donde se cultivaron las plantas en el invernadero (A), selección del tipo de bulbos utilizados (B), y manipulación en condiciones de laboratorio (C).



**Figura 6.** Procesamiento de bulbos de plantas desarrolladas en el invernadero, para su desinfección y obtención de explantes.

### 2.4.3 Introducción del material al cultivo *in vitro*

Los bulbos del Invernadero fueron utilizados para obtener dos tipos de explantes, twin-scales para inducir la formación de bulbillos *in vitro*, y escamas sencillas para inducir la formación de callos. A su vez, a partir de los bulbillos inducidos *in vitro*, se obtuvieron escamas sencillas para inducir callo. De esta manera, se procedió a comparar la respuesta de inducción de callos de explantes (escamas) obtenidos a partir de bulbo desarrollados en el invernadero o partir de los bulbillos obtenidos *in vitro* (**Figura 7**).



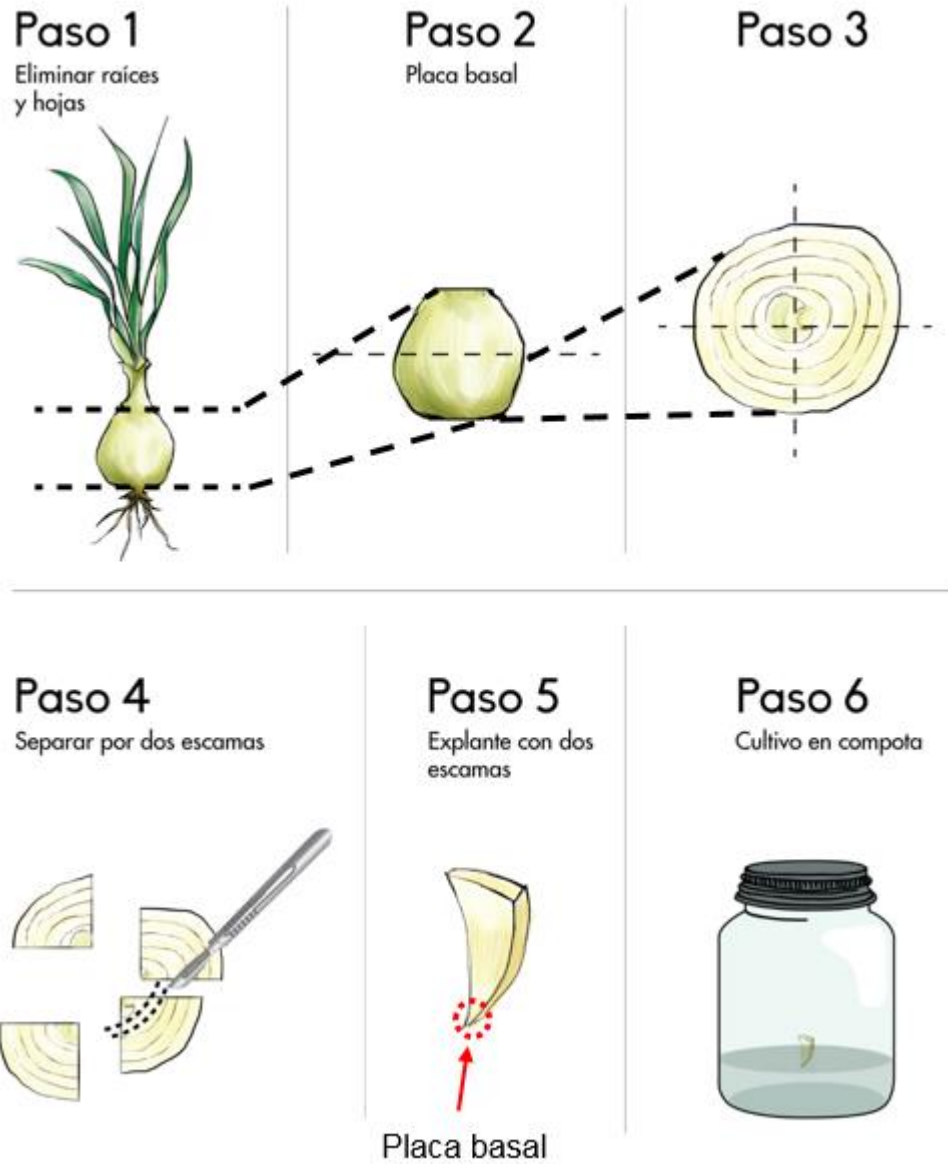
**Figura 7.** Esquema general utilizado para comparar la respuesta en la inducción de callo a partir del material desarrollado en el invernadero o bajo condiciones *in vitro*.

### 2.4.4 Inducción de bulbillos a partir de bulbos de plantas cultivadas en el invernadero

Para inducir bulbillos *in vitro* vía organogénesis a partir de bulbos de invernadero, se utilizó el protocolo estandarizado en el Grupo de Biotecnología Vegetal de la Universidad. Este protocolo consiste en realizar bajo condiciones de asepsia, cortes en cuatro secciones iguales del bulbo y separando de a dos escamas por vez, unidas por su placa basal (twin-scales) (**Figura 8, paso 3**) (Chih Wei Huang, 1990; Bach & Sochacki, 2012; Tofiño, 2017). De cada cuarta, se extrajeron entre 3 y 4 explantes twin-scales (**Figura 8, pasos 4 y 5**). Los explantes fueron sembrados

asegurando que el área de la placa basal del explante estuviera en contacto con el medio de cultivo (**Figura 8 paso 5 y 6; Figura 5C**) para garantizar la apertura de las escamas, que da paso a la formación de nuevos (Rice, Finnie, & Van Staden, 2011; Tofiño 2017). Se cultivaron 2 explantes de twin-scales por cada frasco de compota autoclavado que contenía 25 mL de medio de cultivo MSA1 (medio MS de Murashige y Skoog, 1962 modificado, **Cuadro 1**). El colocar un máximo de 2 explantes por frasco, disminuye la contaminación y proporciona los nutrientes necesarios a cada explante (Tofiño, 2017). En total se sembraron 63 twin-scales en 32 frascos con medio MSA1, explantes obtenidos a partir de 6 bulbos de plantas desarrolladas en el invernadero. Al cabo de 2 meses de cultivo, los bulbillos inducidos se subcultivaron de a tres bulbillos por frasco autoclavado con 25 mL de medio MS para estimular el crecimiento de los bulbillos generados (Tofiño, 2016). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 25°C, fotoperiodo de 16 h bajo luz blanca – 8 h de oscuridad.

## ORGANOGENÉISIS



**Figura 8.** Corte de bulbo para obtener twin-scales y su respectiva siembra para inducir la formación de bulbillos *in vitro*.

### 2.4.5 Medio de cultivo MSA1 para la inducción de bulbillos *in vitro*

Se utilizó como medio base el Murashige & Skoog (1962) modificado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal para la inducción de bulbillos de *Zephyranthes carinata*, el cual consiste en la adición de 0.6 mg/L de bencilaminopurina (BAP) como regulador de crecimiento (Chamorro, 2016; Alizandre 2017; Tofiño 2017) (**Cuadro 1**). Este medio permite inducir al menos un bulbillito en un 70% de los explantes cultivados *in vitro* y produce la inducción de al menos dos bulbillos por escama (Chamorro, 2016; Alizandre, 2017).

Para preparar un Litro de medio sólido MSA1 (**Cuadro 2**), se procedió de la siguiente manera:

1. Preparación del gelificante:
  - a) En un frasco Schott de 1L se disuelven 3,0 g de agente gelificante (Gellan Gum) en 500 mL de agua tipo 2 desionizada y se tapa.
  - b) Se esteriliza la solución en un AUTOCLAVE TUTTNAUER 3150EL a temperatura 121°C, con un tiempo de esterilización de 15 minutos y con un tiempo de secado hasta que el equipo llegue a 85°C.
2. Preparación del medio base nutritivo:
  - a) En un beaker se agrega 500 mL de agua tipo 2 desionizada y 4,43 g/L de sales de Murashige & Skoog (MS)( PhytoTech Laboratories), Se agita en una plancha agitadora hasta disolver todas las sales.
  - b) Se agrega la solución stock de BAP en agitación constante para una concentración final de BAP 0,6 mg/L
  - c) Se agrega 30 g de sucrosa y se agita hasta obtener una solución homogénea
  - d) En la cabina de flujo laminar se esteriliza la solución por filtración, utilizando una membrana de 0,22µm (previamente autoclavada)
  - e) La solución filtrada se almacena en un frasco Schott de 500 mL estéril con tapa.
3. Preparación del medio de cultivo y servida del medio:
  1. Una vez que el gelificante se ha esterilizado en el autoclave, se calienta la solución que contiene el medio base nutritivo en un microondas por dos minutos.
  2. En la cabina de flujo laminar, se mezclan ambas soluciones y se agita manualmente para homogenizar los componentes.
  3. Se sirven 25 mL de medio MSA1 en frascos de compotas estériles.
  4. Se deja enfriar hasta no evidenciar la condensación formada en los bordes de las paredes de la compota.
  5. Se sella y rotula debidamente cada frasco de compota.
  6. El medio se puede usar después de tres días para confirmar que no presente contaminación.

Para el subcultivo de los bulbillos inducidos, se utilizó el medio MS, el cual tiene la misma composición que el MSA1 excepto que no contiene BAP (**Cuadro 1**) (Tofiño, 2017).

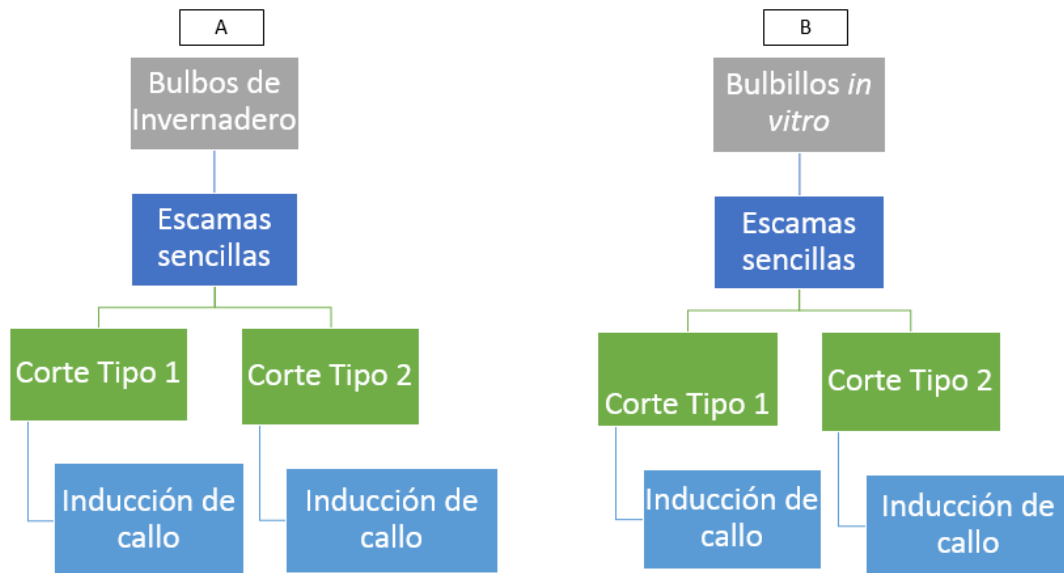
**Cuadro 1.** Composición de los medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) y MSA1 utilizados para la inducción de bulbillos *in vitro* y posterior subcultivo.

	MS		MS-A1	
	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L
<b>Macroelementos</b>				
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	20,61	1650	20,61
KNO <sub>3</sub>	1900	18,79	1900	18,79
MgSO <sub>4</sub>	180,7	1,5	180,7	1,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1,25	170	1,25
<b>Microelementos</b>				
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	0,1	6,2	0,1
MnSO <sub>4</sub> X H <sub>2</sub> O	16,9	0,1	16,9	0,1
ZnSO <sub>4</sub> X 7H <sub>2</sub> O	8,6	0,0299	8,6	0,0299
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> X 2 H <sub>2</sub> O	0,25	0,001	0,25	0,001
CuSO <sub>4</sub> X 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,0001	0,025	0,0001
CoCl <sub>2</sub> X 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,0001	0,025	0,0001
KI	0,83	0,005	0,83	0,005
CaCl <sub>2</sub>	332,2	2,99	332,2	2,99
Na <sub>2</sub> EDTA X 2H <sub>2</sub> O	37,26	0,1052	37,26	0,1052
FeSO <sub>4</sub> X 7H <sub>2</sub> O	27,8	0,1	27,8	0,1
<b>Vitaminas</b>				
Acido nicotínico	0,5	0,0041	0,5	0,0041
Piridoxina. HCL	0,5	0,0024	0,5	0,0024
Tiamina X HCL	0,1	0,0003	0,1	0,0003
Glicina	2	0,0266	2	0,0266
Inositol miocardio	100	0,5551	100	0,5551
<b>Regulador de crecimiento</b>				
BAP	0	0	0,6	0,0027
2,4-D	0	0	0	0
Cinetina	0	0	0	0
<b>Fuente de carbono</b>				
Sacarosa	30000	87,64	30000	87,64
<b>Agentes gelificantes</b>				
Goma gellan	3000		3000	
pH	5,8		5,8	

#### 2.4.6 Evaluación del efecto del origen del material de partida (escamas de bulbos del invernadero o de bulbillos inducidos *in vitro*) sobre la inducción de callos

Para esta evaluación, se colectaron en total 2 bulbos de invernadero en marzo 2017, para inducir callo directamente a partir de escamas sencillas (**Figura 9A**).

Adicionalmente, se utilizaron bulbillos de aproximadamente 8 mm de diámetro, que ya habían sido inducidos previamente en el laboratorio en julio 2016, y mantenidos a través de subcultivos periódicos al menos cada 3 meses por un total de 21 meses, (Figura 9B).



**Figura 9.** Esquema general del procedimiento utilizado para la evaluación del efecto del origen del material vegetal y el tipo de corte en la inducción de callos.

Ensayos realizados previamente en el Grupo de Investigación en Biotecnología de la Universidad Icesi, sugieren que las escamas de bulbillos inducidos y desarrollados *in vitro* tienen una mayor eficiencia en la formación de nuevos bulbillos *in vitro*, que aquellas provenientes de los bulbos del invernadero (Chamorro, 2016; Tofiño, 2017). Por esta razón en este proyecto se decidió evaluar la respuesta a la inducción de callos a partir de escamas de bulbos del invernadero y de bulbillos subcultivados *in vitro*. Los bulbillos *in vitro* utilizados como fuente de escamas, primero se indujeron en el medio MS-A1, y después de dos meses, se sometieron a subcultivos periódicos cada 3 meses en medio MS por un total de 21 meses.

#### 2.4.7 Evaluación del tipo de corte utilizado para obtener los explantes sobre la inducción de callos

Para la evaluación del efecto del tipo de corte sobre la respuesta a la inducción de callos a partir de explantes obtenidos de bulbos de invernadero o de bulbillos *in vitro*



de 21 meses de edad, se realizaron dos tipos de cortes (Corte Tipo 1 y Corte Tipo 2) (**Figura 9**).

El corte tipo 1 fue utilizado en el proyecto de grado de Tofiño 2017 realizado en el grupo de investigación, para inducir la formación de callos. El corte tipo 1 consiste en primero separar las escamas sencillas del bulbo (**Figura 10, paso 4**), para posteriormente realizar cortes longitudinales de manera que cada sección del corte incluya la placa basal del bulbo (**Figura 10, paso 5**), para finalmente subdividir cada sección en dos tipos de explantes: uno que contiene la placa basal, y el otro sin placa basal (**Figura 10, paso 6**). A cada escama sencilla se le realizan cortes longitudinales para que el explante tenga una mayor exposición al medio de cultivo en el momento de la siembra. Los explantes fueron sembrados con el lado adaxial en contacto con su respectivo medio de cultivo para inducir la formación de callo.

## EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA: CORTE TIPO 1

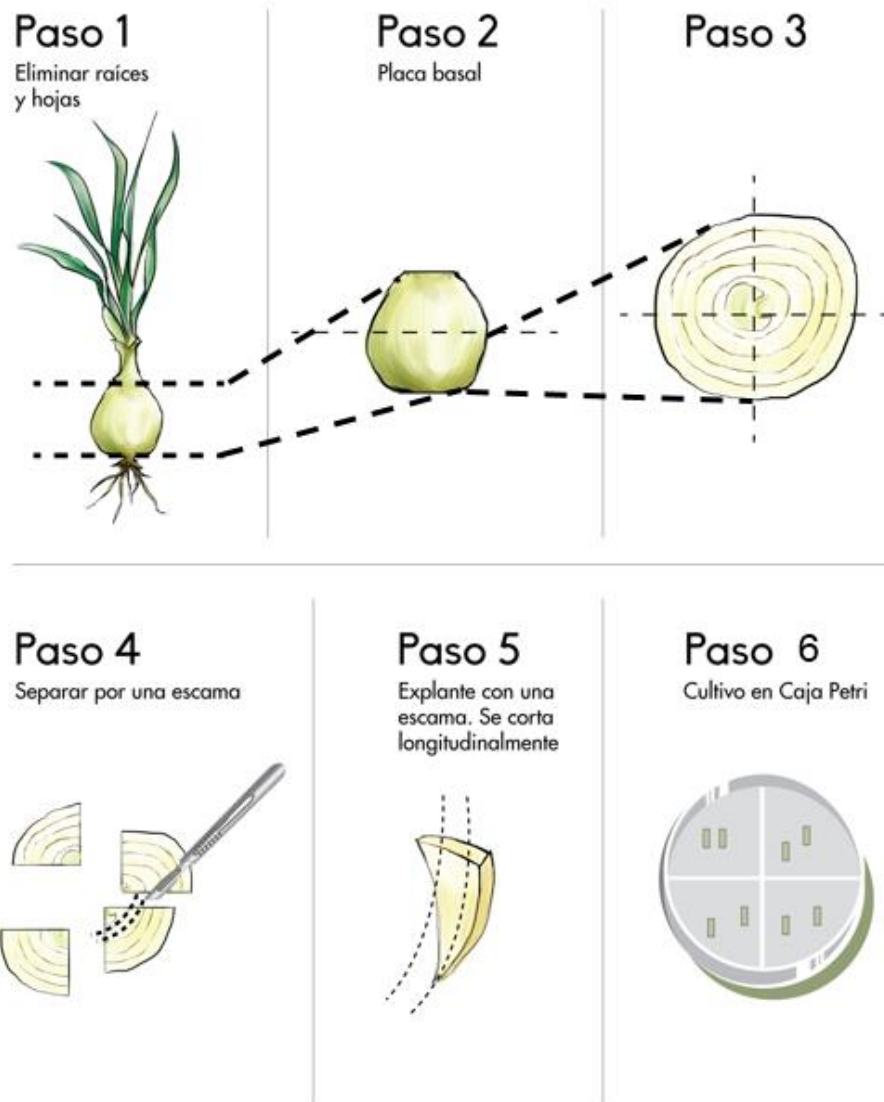
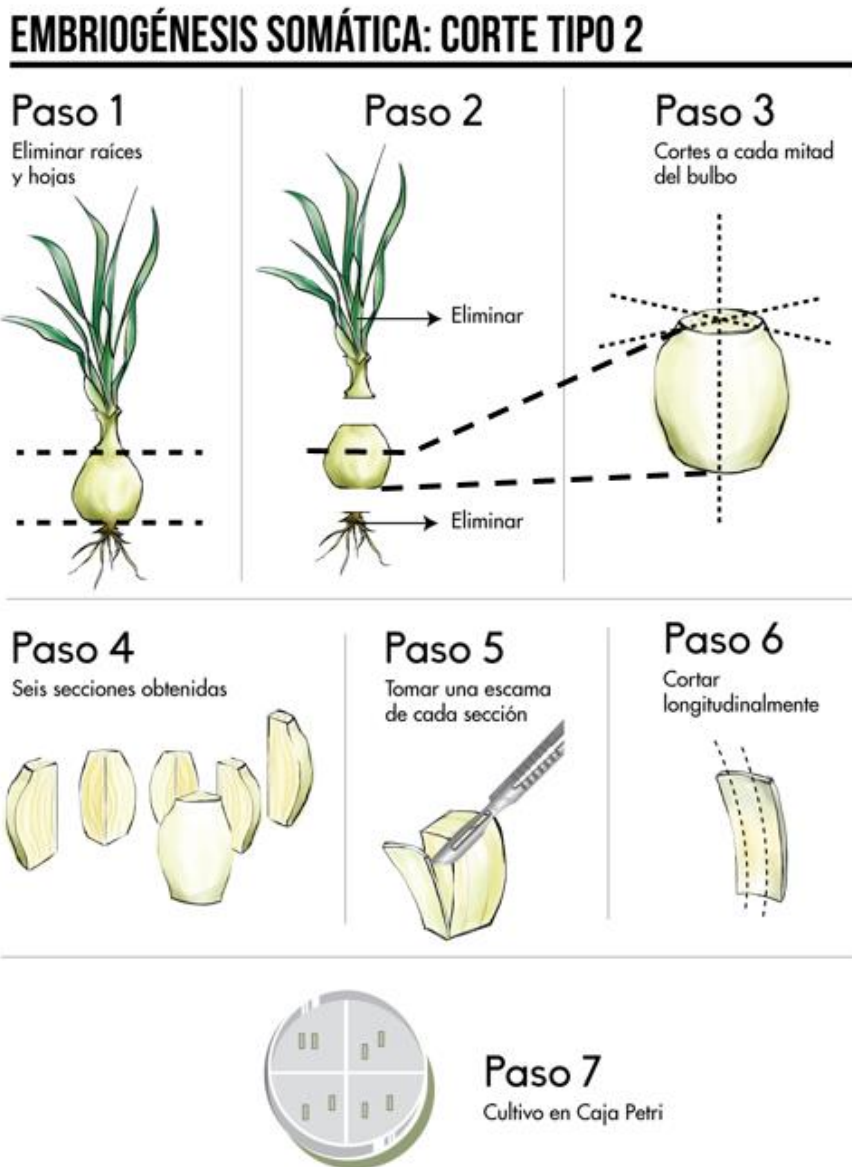


Figura 10. **Corte Tipo 1** utilizado para la obtención de explantes a partir de escamas sencillas del bulbo y posteriormente inducir formación de callo.

El Corte Tipo 2, se realizó teniendo en cuenta la metodología utilizada por Bedoya & Ríos, (2010), con la siguiente modificación, la cual consiste en realizar dos cortes a cada mitad del bulbo para obtener 6 secciones en total (**Figura 11, pasos 3 y 4**). Posteriormente, se separaron las escamas sencillas del bulbo (**Figura 11, paso 5**), para posteriormente realizar cortes longitudinales de manera que cada sección del corte incluya la placa basal del bulbo (**Figura 11, paso 6**). Los explantes fueron

sembrados con el lado adaxial en contacto con su respectivo medio de cultivo para inducir la formación de callo (**Figura 11, paso 7**). Los explantes utilizados provienen de la parte intermedia e inferior del bulbo, debido a que se ha demostrado que estas zonas son las que promueven la mayor inducción de callos y la formación de embriones somáticos cuando se cultivan en el medio de cultivo adecuado (Niño et al., 2005; Vargas et al., 2006; Anbari et al., 2007; Bedoya & Ríos, 2010).



**Figura 11.** Corte Tipo 2 de bulbo para obtener la inducción de embriogénesis.

Los explantes, tanto del corte Tipo 1 o corte Tipo 2, fueron sembrados en el medio MSES4-M, el cual consiste en medio basal MS con 0,4 mg/L 2,4-D, 1,5 mg/L cinetina

y 30 g/L (3%) de maltosa como fuente de carbono. Por cada tipo de corte y origen del material de partida (invernadero o *in vitro*), se sembraron aproximadamente 14 explantes en cada caja Petri con 30 mL de medio MSES4-M, para un total de 394 explantes en 28 cajas Petri, en dos experimentos (**Cuadro 2**), de los 181 explantes eran provenientes de bulbillos inducidos y subcultivados *in vitro*, y 213 explantes de los bulbos de invernadero (**Cuadro 2**). Al cabo de 3 meses de inducción, se separaron de las escamas los callos formados, y estos callos se sub-cultivaron nuevamente en medio MSES4-M por 4 semanas más para inducir la formación y proliferación de callos embriogénicos. Las evaluaciones se realizaron al cabo de 4 semanas. Los cultivos se mantuvieron en un cuarto de crecimiento a 26°C, 44% humedad relativa y 24 horas de oscuridad, por 4 meses en total. Las evaluaciones del tipo de callo formado fueron evaluadas como se describe en la sección 2.4.7.

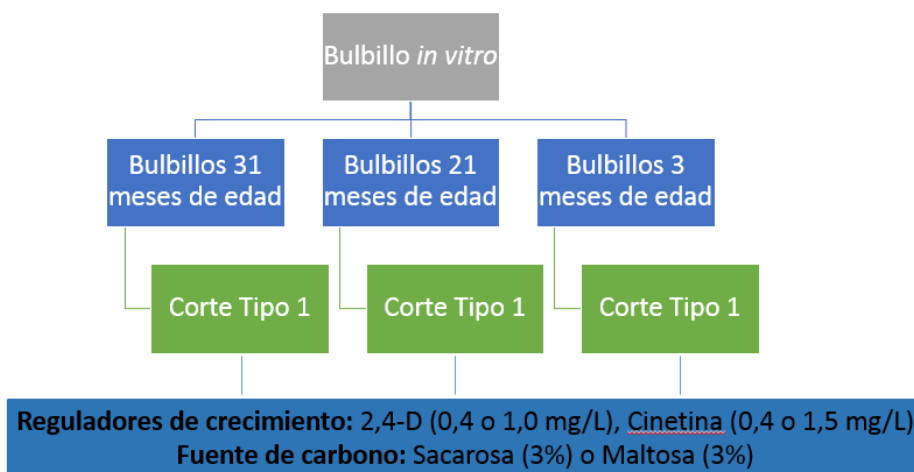
**Cuadro 2.** Experimentos realizados para la evaluación del efecto del origen del material vegetal (bulbos de invernadero o bulbillos *in vitro* de 21 meses de edad) y el tipo de corte (Corte Tipo 1 o Corte Tipo 2) en la inducción de callos.

Tipo de Corte	Fuente del material vegetal	Experimentos	Explantes	Cajas Petri
Tipo 1	Invernadero	1	40	4
		2	61	4
		Subtotal	101	8
	<i>In vitro</i>	1	53	4
		2	38	3
		Subtotal	91	7
Tipo 2	Invernadero	1	66	4
		2	46	3
		Subtotal	112	7
	<i>In vitro</i>	1	45	3
		2	45	3
		Subtotal	90	6
Fuente del Material	Invernadero	<b>Total</b>	<b>213</b>	<b>15</b>
	<i>In Vitro</i>	<b>Total</b>	<b>181</b>	<b>13</b>
		<b>TOTAL</b>	<b>328</b>	<b>28</b>

#### 2.4.8 Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de callos

Para esta evaluación se utilizaron bulbillos inducidos *in vitro* y subcultivados por 3 meses, 21 meses o 31 meses. Los explantes fueron obtenidos utilizando el Corte Tipo 1, y sembrados en medios que contenían diferentes combinaciones de

reguladores de crecimiento y fuente de carbono, siguiendo el diagrama descrito en la **Figura 12**.



**Figura 12.** Esquema general del procedimiento utilizado para la evaluación de la combinación y concentración de reguladores de crecimiento y fuente de carbono.

Para la inducción de callos se emplearon ocho modificaciones del medio de Murashige y Skoog (MS) (1962) (**Cuadro 3**). Estas modificaciones se basaron en el trabajo de Bedoya & Ríos (2010), quienes estudiaron el efecto de diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento en la inducción de embriogénesis somática en *Crinum x powellii album*, otra especie de amarilidácea. En este proyecto de grado se evaluaron dos concentraciones de 2,4-D (0,4 mg/L o 1,0 mg/L) en combinación con cinetina (0,4 mg/L o 1,5 mg/L), en cuatro combinaciones suplementadas con 3% sacarosa o 3% maltosa, lo cual dio lugar a ocho medios denominados MSES3, MSES4, MSES7 y MSES8 con sacarosa, y MSES3-M, MSES4-M, MSES7-M y MSES8-M con maltosa, como se muestra a continuación en el Cuadro 3. Se sembraron en total 2,652 explantes provenientes del Corte Tipo 1, en cajas Petri (15 explantes por caja Petri) con 30 mL, distribuidos en los 8 medios, en dos experimentos (**Cuadro 4**).

**Cuadro 3.** Medios MS suplementados con ocho combinaciones de 2,4-D y cinetina, y dos fuentes de carbono, utilizados para evaluar la inducción de callos en *Zephyranthes carinata*.

Reguladores de Crecimiento		Fuente de Carbono (30 g/L)	Medio
2,4-D (mg/L)	Cinetina (mg/L)		
0,4	0,4	sacarosa	MSES3
		maltosa	MSES3-M
	1,5	sacarosa	MSES4
		maltosa	MSES4-M

1	0,4	sacarosa	MSES7
		maltosa	MSES7-M
	1,5	sacarosa	MSES8
		maltosa	MSES8-M

El procedimiento utilizado para el aislamiento, el cultivo de los explantes, el subcultivo tiempo de evaluación de los callos inducidos fue similar al descrito en la sección 2.4.4. Antes de cortar los explantes (**Figura 10**), se midió el diámetro de cada uno de los bulbillos *in vitro* con edades de 31, 21 y 3 meses después de la inducción (los bulbillos se inducen aproximadamente 4 semanas después del cultivo de las twin-scales). Los bulbillos de 31 y 21 meses de edad medían aproximadamente 10 mm de diámetro, mientras que los bulbillos de 3 meses medían aproximadamente 4 mm de diámetro. La caracterización del tipo de callo inducido se describe en la sección 2.4.7.

**Cuadro 4.** Experimentos realizados para la evaluación del efecto de la composición del medio de cultivo en la inducción de callos utilizando el corte tipo 1.

Número de escamas cultivadas <i>in vitro</i> corte Tipo 1				
Medio de cultivo	Experimentos	Bulbillos 31 meses de edad	Bulbillos 21 meses de edad	Bulbillos 3 meses de edad
MSES3	1	150	42	33
	2	160	36	58
	<b>Subtotal</b>	<b>310</b>	<b>78</b>	<b>91</b>
MSES3M	1	82	39	48
	2	72	42	53
	<b>Subtotal</b>	<b>154</b>	<b>81</b>	<b>101</b>
MSES4	1	68	48	49
	2	72	48	62
	<b>Subtotal</b>	<b>140</b>	<b>96</b>	<b>111</b>
MSES4M	1	77	41	50
	2	86	47	50
	<b>Subtotal</b>	<b>163</b>	<b>88</b>	<b>100</b>
MSES7	1	69	39	40
	2	72	75	59
	<b>Subtotal</b>	<b>141</b>	<b>114</b>	<b>99</b>
MSES7M	1	79	40	47
	2	73	43	56
	<b>Subtotal</b>	<b>152</b>	<b>83</b>	<b>103</b>
MSES8	1	17	40	47
	2	20	43	60
	<b>Subtotal</b>	<b>37</b>	<b>83</b>	<b>107</b>
MSES8M	1	31	33	16

	2	38	38	64
	<b>Subtotal</b>	69	71	80
	<b>Total</b>	1166	694	792

## 2.4.9 Evaluación de la fuente de carbono en la inducción de callos

Para evaluar el efecto de la fuente de carbono, se adicionó 30 g/L (3%) de sacarosa o maltosa a cada combinación base de 2,4-D y cinetina (**Cuadro 3**), de esta forma la misma combinación de reguladores de crecimiento fue evaluada con las dos fuentes de carbono. Para distinguir los medios que contienen sacarosa de los de maltosa, se les colocó la letra “-M” al final del nombre del medio con similar composición y concentraciones de reguladores de crecimiento (**Cuadro 3**).


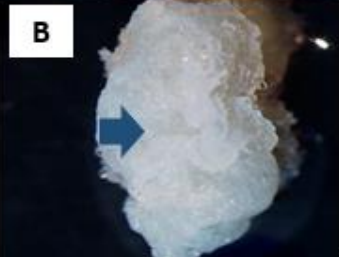
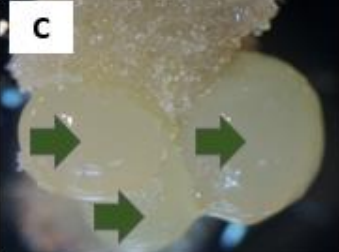
### 2.4.10 Registro y evaluación del material vegetal

Se evaluaron los siguientes factores para cada explante de acuerdo al tipo de experimento realizado:

- 1) Porcentaje de respuesta, que es la relación del número de explantes con inducción de bulbillito o callo dividido por el número total de explantes sembrados X 100.
- 2) El tipo de callo inducido de acuerdo a la descripción mostrada en el Cuadro 5. Los callos inducidos fueron diferenciados en tres tipos: a) Callo Friable Tipo 1, tejido no organizado de apariencia vidriosa y traslúcida; b) Callo Friable Tipo 2, tejido no organizado de apariencia algodonosa y traslúcida; y c) Callo Embriogénico, tejido organizado, con apariencia nodular y de color amarillo (**Cuadro 5**). Esta información fue registrada mensualmente con ayuda de un estereoscopio (Marca Nikon, modelo SMZ 445 C-LEDS), para facilitar la visualización de los callos.

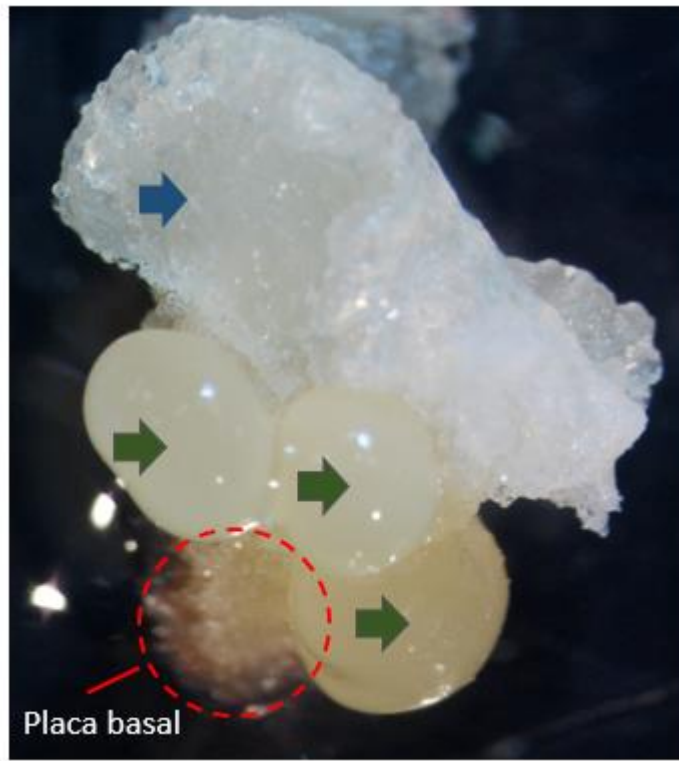
**Cuadro 5.** Tipos de callos inducidos en *Zephyranthes carinata* a partir de escamas de bulbos de invernadero o bulbillos *in vitro*. **A)** Callo friable tipo 1 (flecha roja), formado a partir de la placa basal de escamas de bulbos de invernadero. **B)** Callo friable tipo 2 (flecha azul) formado a partir de la placa basal, proveniente de bulbillos *in vitro*, callo que continuó su crecimiento después de dos meses de inducción. **C)**

Callo embriogénico (flecha verde) formado a partir de la placa basal de explantes proveniente de bulbillos *in vitro*, luego de dos meses de inducción.

Tipo de callo	Característica	Fenotipo
<b>Friable Tipo 1</b>	Tejido no organizado, de apariencia vidriosa y traslucida	
<b>Friable Tipo 2</b>	Tejido no organizado, de apariencia algodonosa y traslucida	
<b>Callo Embriogenico</b>	Apariencia nodular y coloracion amarilla	

Cada explante fue evaluado por presencia o ausencia de formación de callo, lo que permitió determinar la frecuencia de respuesta para cada tratamiento. Adicionalmente cuando se registró formación de callo, se identificó el tipo de callo formado de acuerdo a las características descritas anteriormente (Cuadro 5) y el área de cobertura en la totalidad de cada explante. De acuerdo a lo anterior, y como ejemplo se ilustra la **Figura 13**, donde se muestra un explante con respuesta, con inducción de callo friable tipo 2 en la región superior del explante y callo embriogénico en la región la inferior del explante.





**Figura 13.** Formación de callo en la totalidad del explante, con inducción de callo friable tipo 2 (flecha azul) y callo embriogénico (flecha verde), formado a partir de la placa basal (círculo rojo).

#### 2.4.11 Diseño experimental y análisis estadísticos

Se realizó un diseño completamente al azar con estructura factorial, siendo los factores: Procedencia (bulbos de invernadero o bulbillos *in vitro*), tipo de corte (corte tipo 1 y corte tipo 2), concentración y combinación de reguladores de crecimiento (0,4 y 1,0 mg/L de 2,4-D o 0,4 y 1,5 mg/L de cinetina) y fuente de carbono (sacarosa o maltosa). Para ello fue necesario realizar el procedimiento GLM (Modelo Lineal Generalizado), con el fin de utilizar el método de mínimos cuadrados para ajustar modelos lineales generales sobre la respuesta de inducción de callo en *Zephyranthes carinata*.

Para analizar si existían diferencias significativas entre los resultados, se prosigió con el LSD (*Least Significant Difference*) que permite calcular el valor más significativamente pequeño entre los factores individuales y sus interacciones con los demás. Los explantes se sembraron al azar dentro de cada caja Petri con su respectiva concentración y combinación de reguladores de crecimiento.

## 2.5 RESULTADOS

### 2.5.1 Mejoras en la metodología de desinfección para la obtención de explantes twin-scales y escamas sencillas, a partir de bulbos de plantas desarrolladas en el invernadero.

Uno de los principales problemas para la obtención de explantes twin-scales y escamas sencillas, a partir de bulbos de plantas desarrolladas en el invernadero, es la contaminación con hongos y bacterias. Esto es debido a que los bulbos de las plantas se desarrollan dentro de la tierra. Por esta razón, se modificó el protocolo de desinfección que se venía utilizando en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi (Protocolo 1, Anexo 1), por el descrito en la sección 2.4.1.1. (Protocolo 2), el cual permitió reducir en forma significativa la contaminación en los cultivos *in vitro*. Sin embargo se debe aclarar que para la obtención de explantes totalmente libres de contaminación, es importante realizar la desinfección de máximo de 3 bulbos de invernadero por lote de desinfección; y en cuanto a los explantes twin-scales y escamas sencillas, se deben descartar las últimas dos escamas más externas del bulbo, de lo contrario el porcentaje de contaminación incrementa hasta un 100% cuando éstas son utilizadas como explantes, lo que resulta en una contaminación total del experimento.

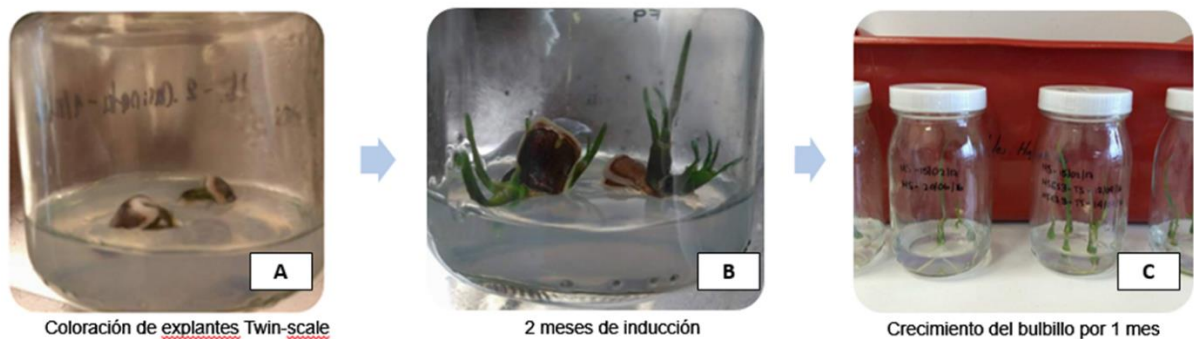
Al utilizar el nuevo protocolo de desinfección (Protocolo 2), el cual incorpora el uso de sustancias antimicrobianas y anti fúngicas como son el dodecil dietilen diaminoglicina y dodecilano propilglicina, además de las sustancias tradicionalmente utilizadas como son el etanol y el hipoclorito de sodio, fue posible lograr 0% de contaminación de un total de un de 720 explantes twin-scales cultivados *in vitro*. Mientras que cuando se utilizó el protocolo anterior (Protocolo 1), la contaminación fue del 23% de un total de 276 explantes de twin-scales a partir de 2 bulbos del invernadero utilizados para la inducción de bulbillos *in vitro* vía organogénesis (**Cuadro 6**).

**Cuadro 6.** Porcentaje de contaminación de twin-scales utilizados para la inducción de bulbillos, a partir de bulbos de *Zephyranthes carinata* desarrollados en el invernadero.

Protocolo de Desinfección	Total de Explantes	Explantes contaminados a los 3 días	Explantes contaminados (%)
Protocolo 1	276	63	22
Protocolo 2	720	0	0

## 2.5.2 Inducción de bulbillos a partir de bulbos de plantas cultivadas en el invernadero

Después de dos semanas de inducción, las twin-scales sembradas en el medio MSA1 tomaron una coloración verde en la superficie de las escamas (**Figura 14A**). Alrededor del mes hubo apertura de las escamas y posteriormente se observó el crecimiento de brotes, lo cual dio paso a la formación de bulbillos (**Figura 14B**). Posteriormente a los de 2 meses de cultivo *in vitro*, se subcultivaron un total de 98 bulbillos, los cuales se indujeron a partir de las 63 twin-scales cultivadas inicialmente, dando un promedio de respuesta del 155,6%. Es decir, se formaron entre uno y dos bulbillos por cada twin-scale cultivada. El porcentaje de respuesta se calculó contabilizando el número de escamas que produjeron al menos un bulbillito respecto al total de explantes twin-scale cultivadas (Alizandre, 2017). Finalmente, estos 98 bulbillos se subcultivaron en medio MS durante un mes para permitir un mejor crecimiento de los bulbillos (**Figura 14C**), y así obtener escamas sencillas a partir de las cuales se evaluó la respuesta a la inducción de callo.

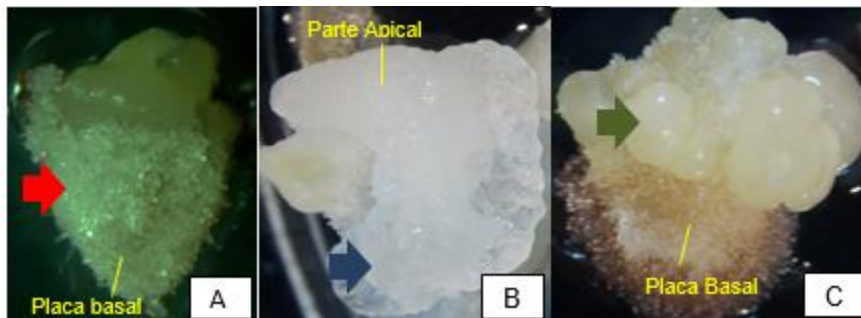


**Figura 14.** Inducción de bulbillos a partir de twin-scales obtenidos de bulbos de plantas cultivadas en el invernadero. **(A)** Twin-scales después de 2 semanas en cultivo *in vitro* mostrando coloración verde en la superficie de las escamas. **(B)** Bulbillos y brotes emergiendo de twin-scales después de 2 meses de cultivo. **(C)** Bulbillos subcultivados en medio MS para permitir mejor crecimiento y desarrollo de los bulbillos.

## 2.5.3 Efecto del origen del material (escamas de bulbos del invernadero o de bulbillos inducidos *in vitro*) sobre la inducción de callos

En este caso, se evaluaron dos tipos de procedencias del material vegetal, es decir, escamas obtenidas a partir de bulbillos inducidos previamente en el laboratorio en condiciones *in vitro*, o a partir de bulbos de invernadero. Para ambas procedencias se obtuvieron explantes utilizando los dos tipos de cortes (Tipo 1 y Tipo 2) (Sección

2.4.4, **Figuras 10 y 11**), los cuales se sembraron en el medio MSES4-M (MS con 0,4 mg/L 2,4-D, 1,5 mg/L cinetina y 3% maltosa). A las dos semanas de cultivo, se observó la formación de callo en la región de la placa basal (**Figura 15**). En el caso de los explantes obtenidos a partir de bulbos de invernadero, se observó una mayor formación de callo friable Tipo 1 (**Figura 15A**), mientras que en el caso de escamas de bulbillos subcultivados *in vitro* se observó en general crecimiento de callo friable Tipo 2 (**Figura 15B**). Luego del primer mes de inducción, se observó el inicio de la formación de callo embriogénico a partir de la placa basal (**Figura 15C**), en contraste con el callo friable Tipo 2 cuyo crecimiento continuó incrementando en la medida que transcurrió el tiempo de cultivo. Al cabo de dos meses de inducción, el callo friable Tipo 2 aumentó cubriendo casi la totalidad del área del explante desde la placa basal hasta la parte apical (**Figura 15B**). Adicionalmente, hubo un aumento significativo de callo embriogénico observado inicialmente desde la placa basal hasta cubrir el explante en su totalidad (**Figura 15C**).



**Figura 15.** Formación de callo friable y callo embriogénico a partir de escamas de bulbos de invernadero y bulbillos *in vitro* en medio MSES4-M. **A)** Callo friable Tipo 1 (flecha roja) durante las dos primeras semanas de inducción, formado a partir de la placa basal de escamas de bulbos de invernadero. **B)** Callo friable Tipo 2 (flecha azul) formado a partir de la placa basal, proveniente de bulbillos *in vitro*, callo que continuó su crecimiento después de dos meses de inducción. **C)** Callo embriogénico (flecha verde) formado a partir de la placa basal de explantes provenientes de bulbillos *in vitro*, luego de dos meses de inducción.

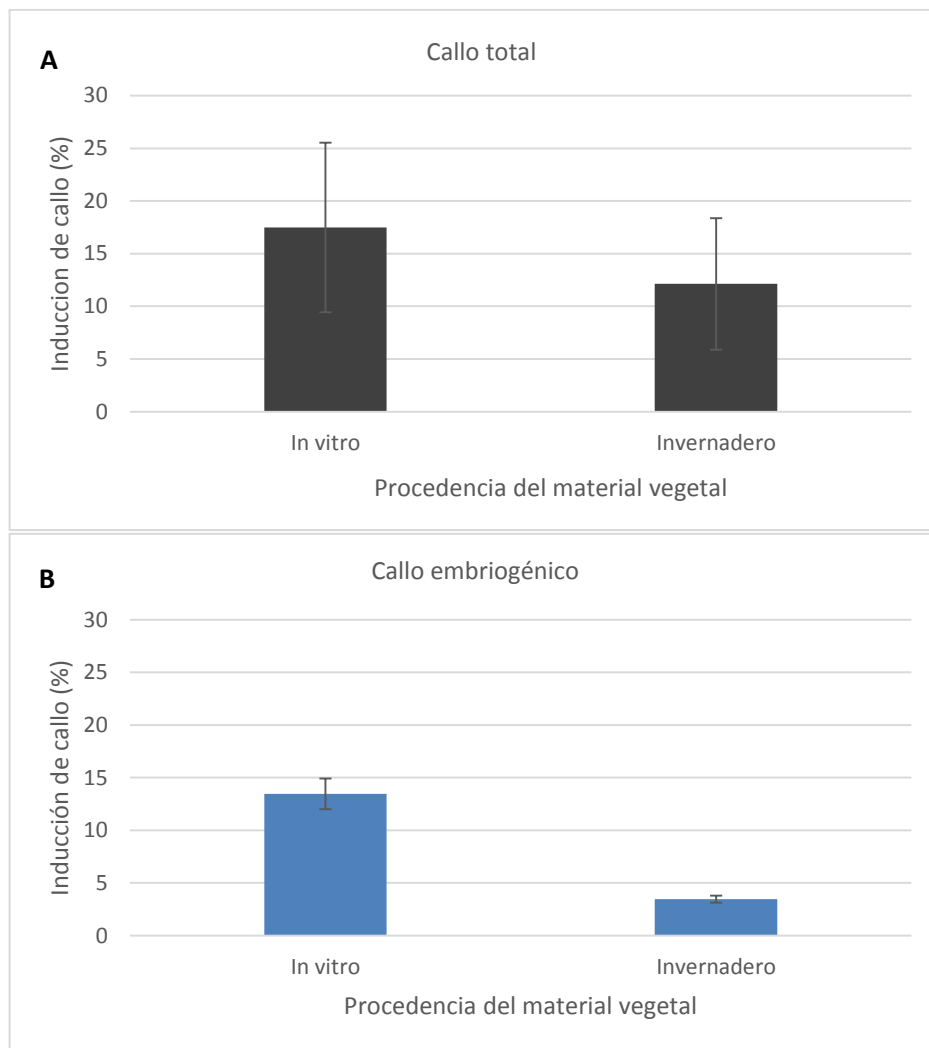
Los callos friables se caracterizaron por un crecimiento desorganizado y apariencia traslúcida (**Cuadro 5, Figura 13, Figuras 15A y 15B, Figura 16A**), mientras que los callos embriogénicos se caracterizaron por la formación de estructuras organizadas, compactas, de aspecto nodular, y de coloración amarilla (**Cuadro 5, Figura 13, Figura 15C, Figura 16B**). Luego del tercer mes, se separaron del explante los callos friables y embriogénicos formados durante el primer y segundo mes de cultivo, respectivamente, y se subcultivaron en medio fresco MSES4-M (**Figura 16A y 16B**). Cabe mencionar que al subcultivar los callos embriogénicos se sembraron en porciones de masas grandes (**Figura 16B**), también se dividieron los callos embriogénicos en porciones más pequeñas de 1 a 2 mm de diámetro y además se separaron de manera individual para saber si existía una influencia de

la exposición del callo al medio de cultivo. Sin embargo, de ninguna manera se logró la proliferación del callo embriogénico.



**Figura 16.** Callos subcultivados después de 3 meses de inducción en *Zephyranthes carinata* en el medio de cultivo MSES4M A) Callo friable tipo 2 (flecha azul) sin crecimiento luego de 4 semanas de subcultivo en el medio MSES4M B) Callo embriogénico sembrado en porciones de masas grandes (flecha verde) sin crecimiento luego de 4 semanas de subcultivo en el medio MSES4M.

En relación a la posible influencia que puede tener el origen del material sobre la respuesta a la inducción de callo (friable y embriogénico), en general se observó que las escamas provenientes de bulbillos *in vitro* mostraron una mayor inducción de callo, principalmente de callo embriogénico, donde las diferencias son aproximadamente 4 veces mayor respecto a las escamas de bulbos de invernadero (**Figura 17, Cuadro 7**). En promedio las escamas de bulbillos *in vitro* presentaron 17,5% de inducción de callo total, con un error estándar de 8,05, en comparación a las de bulbos de invernadero cuya respuesta fue del 12,1% y un error estándar de 6,24 (**Cuadro 7, Figura 17A**). Es decir, material vegetal mantenido y subcultivado en condiciones *in vitro* respecto a material vegetal proveniente directamente de campo resultaron con mayor inducción de callo total. De igual manera, los bulbillos *in vitro* respondieron con una mayor inducción en cuanto a formación de callo embriogénico ( $p:0,7799$ ) del 13,5% y un error estandar del 1,45, mientras que los bulbos de invernadero tuvieron una respuesta del 3,5% con un error estandar 0,34 (**Cuadro 7, Figura 17B**).



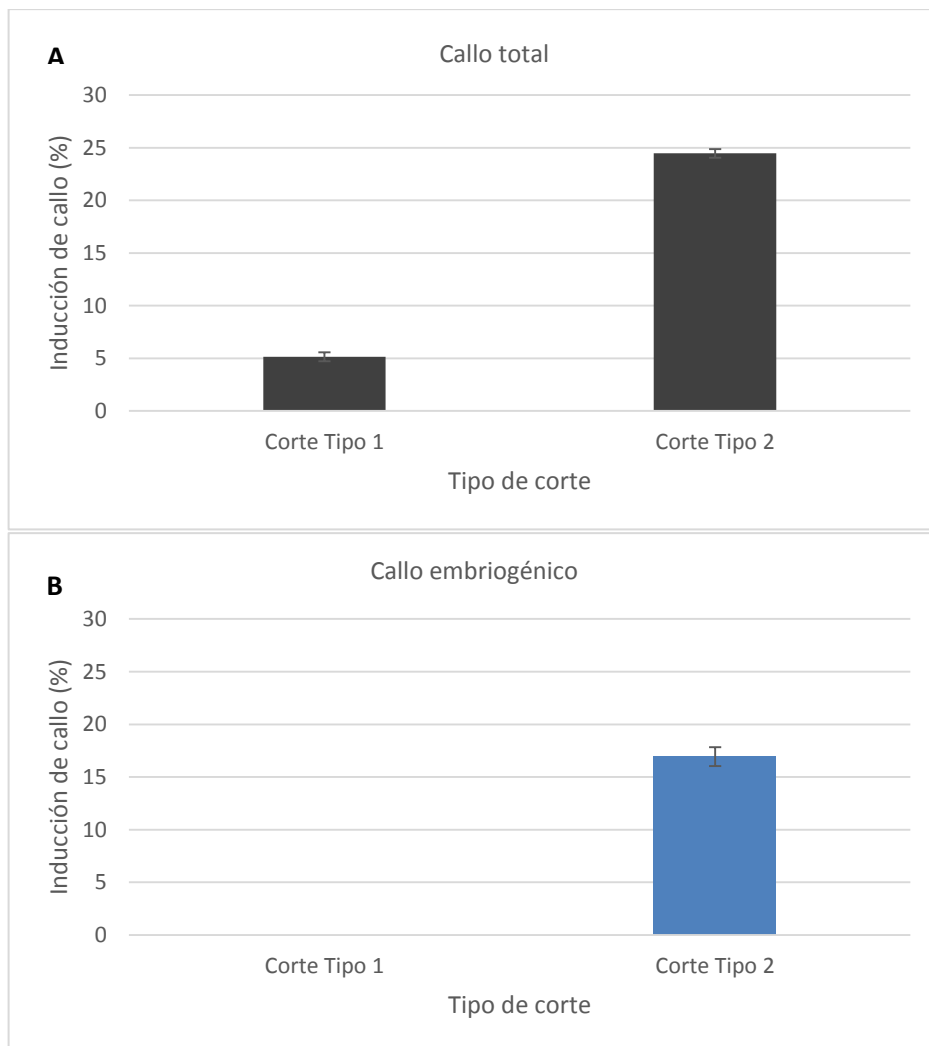
**Figura 17.** Porcentaje de explantes con inducción de callo total ( $n = 394$ ) **(A)** y callo embriogénico ( $n = 394$ ) **(B)** a partir de escamas de bulbos de invernadero o de bulbillos *in vitro*, después de tres meses de cultivo en medio MSES4-M. Las barras de error indican el error estándar con respecto a la media.

**Cuadro 7.** Formación de callos a partir de explantes provenientes de bulbos de invernadero o bulbillos *in vitro*, después de tres meses de cultivo en el medio MSES4-M.

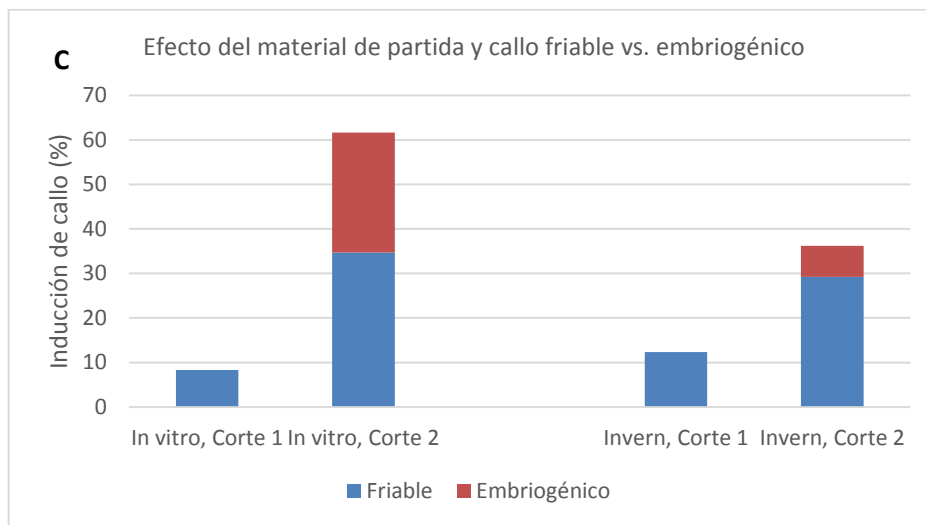
INDUCCIÓN DE CALLO (%)			
Procedencia	Callo Total	Callo Embriogénico	Número de escamas
In vitro	17,5 ± 8,05	13,5 ± 1,45	181
Invernadero	12,1 ± 6,24	3,5 ± 0,34	213

## 2.5.4 Efecto del tipo de corte utilizado para generar el explante en la respuesta de las escamas

En general, el corte tipo 2 presentó una mayor inducción de callo total y embriogénico independientemente del origen del explante (**Figura 18A y 18B, Cuadro 8**). Sin embargo, la proporción del tipo de callo que se induce es significativamente diferente de acuerdo al origen del material vegetal, y estas diferencias son mayores cuando el explante proviene del corte tipo 2 (**Figura 18C, Cuadro 8**). Las escamas de bulbillos *in vitro* mostraron aproximadamente 4 veces mayor inducción de callo embriogénico ( $p: 0,0064$ ) (26,9% con un error estándar de 6,40) que las provenientes de bulbos del invernadero (6,9% con un error estándar de 6,93) (**Figura 18C**). No se observó inducción de callo embriogénico a partir del corte tipo 1, independientemente del origen del material vegetal (**Figura 18B**).







**Figura 18.** Porcentaje de explantes con inducción de callos a partir de explantes con corte Tipo 1 y corte Tipo 2 de escamas de bulbos de invernadero o de bulbillos *in vitro* después de tres meses de cultivo en el medio MSES4-M. **(A)** Efecto del tipo de corte sobre la inducción de callo total ( $n = 394$ ). **(B)** Efecto del tipo de corte sobre la inducción de callo embriogénico ( $n = 394$ ). **(C)** Interacción entre el material de procedencia y el tipo de corte sobre la inducción de callo friable y embriogénico. Las barras de error indican el error estándar con respecto a la media ( $n = 394$ ).

**Cuadro 8.** Respuesta en la formación de callos a partir de escamas provenientes de bulbos de invernadero o bulbillos *in vitro*, utilizando el corte tipo 1 y corte tipo 2, después de tres meses de cultivo en el medio MSES4-M.

Tipo de corte	Procedencia	Promedio porcentaje de respuesta				Total explantes
		CF	CE	CT	CE	
Corte Tipo 1	IV	8,3	0	5,1	0	192
	IN	12,3	0			
Corte Tipo 2	IV	34,7	26,9	24,5	16,9	202
	IN	29,2	6,9			

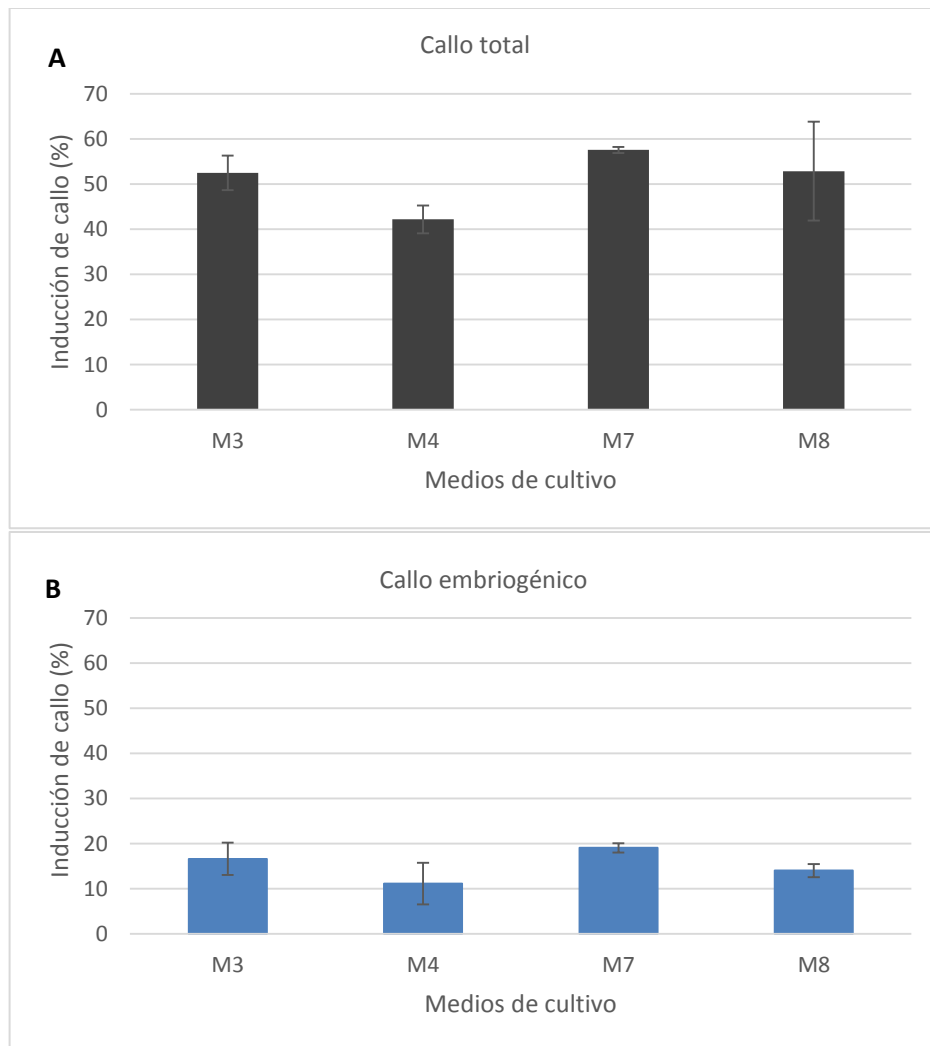
IV: *In vitro*; IN: Invernadero; CF: callo friable; CT: callo total; CE: callo embriogénico

### 2.5.5 Efecto del medio de cultivo sobre la inducción de callos.

La evaluación del efecto del medio de cultivo en la inducción de callo total y embriogénico, se muestra en la **Figura 19** y **Cuadro 9**. En general, se observa una



tendencia a una mayor inducción de callo total en el medio M7 (1,0 mg/L 2,4-D, 0,4 mg/L cinetina) con 57,6%, seguido de los medios M8 (52,9%) y M3 (52,5) (Figura 18A) (Cuadro 11). La menor inducción de callo total (42,2%)(Figura 19A, Cuadro 9) se observó en el medio M4 (0.4 mg/L 2,4-D, 1,5 mg/L cinetina). Este patrón de respuesta se mantuvo también en la inducción de callo embriogénico ( $p$ : 0,3494), obteniéndose la mayor respuesta en el medio M7 (19,0%), seguidos del M3 (16,6%) y del M8 (14,1%), como se muestra en la Figura 19B. La menor inducción de callo embriogénico se obtuvo en el medio M4 (Figura 19, Cuadro 9).



**Figura 19.** Porcentaje de explantes con inducción de callo total ( $n = 2,652$ ) (**A**) y embriogénico ( $n = 2,652$ ) (**B**) en diferentes medios de cultivo, a partir de explantes con corte Tipo 1 de escamas de bulbillos *in vitro* de 3, 21 y 31 meses de edad,

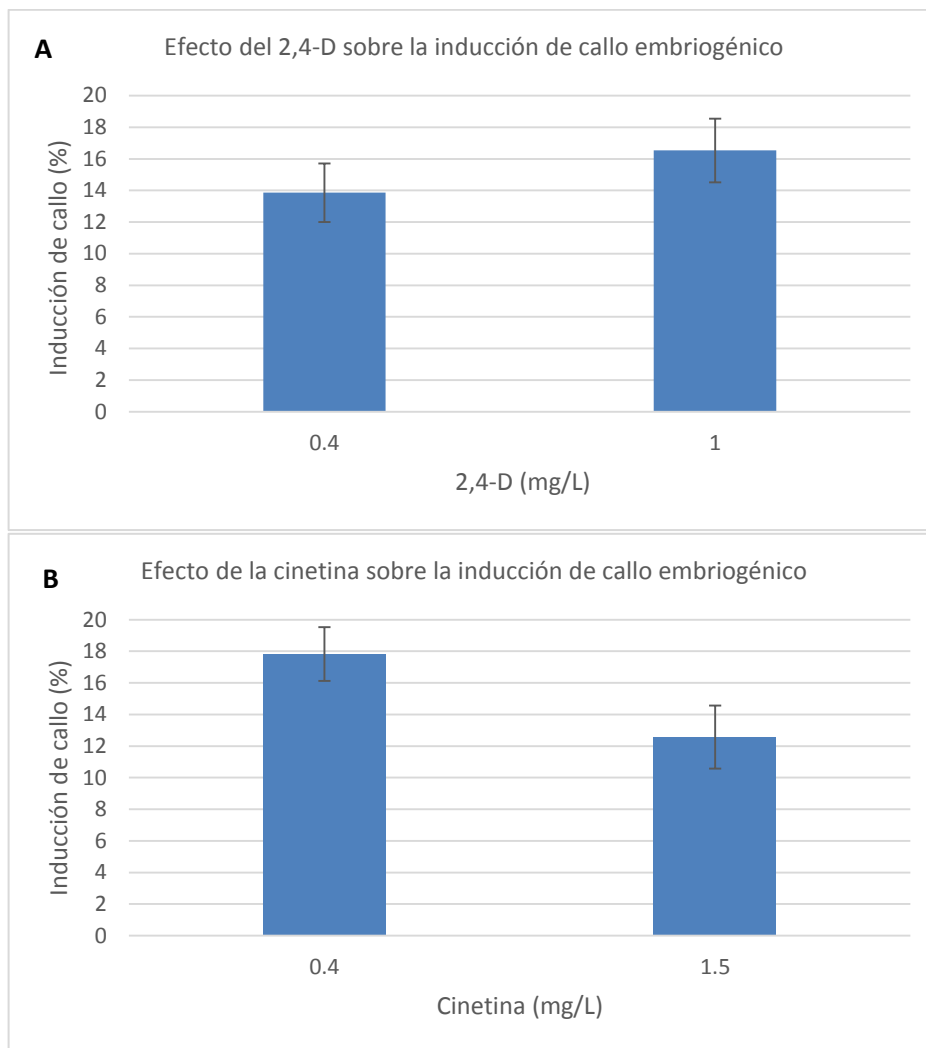
después de un mes de cultivo. Las barras de error indican el error estándar con respecto a la media.

**Cuadro 9.** Formación de callos totales y embriogénicos en escamas de bulbillos in vitro después de un mes de cultivo en diferentes medios de cultivo.

INDUCCIÓN DE CALLO TOTAL (%)			
Medio de cultivo	Promedio	Error estándar	No de escamas
M3	52,5	3,85	815
M4	42,2	3,09	698
M7	57,6	0,64	692
M8	52,9	10,97	447
INDUCCIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO (%)			
Medio de cultivo	Promedio	Error estándar	No de escamas
M3	16,6	3,57	815
M4	11,1	4,61	698
M7	19,0	1,04	692
M8	14,0	1,45	447

### 2.5.6 Efecto del 2,4-D y cinetina en la inducción de callo embriogénico.

De acuerdo a lo descrito en la sección 2.5.3, se observó una respuesta diferencial tanto en la inducción de callo total como en la de callo embriogénico (**Figuras 19A y 19B**), dependiendo del medio de cultivo. Cuando se analiza la respuesta de acuerdo al contenido de los reguladores de crecimiento del medio, se observan incrementos significativos en la inducción de callos embriogénicos en medios que contienen 1 mg/L 2,4-D (**Figura 20A**) o 0,4 mg/L de cinetina (**Figura 20B**), este resultado coincide con la mayor respuesta observada en el medio M7 (**Figura 19B**), que corresponde al medio que contiene 1,0 mg/L 2,4-D y 0,4 mg/L cinetina.

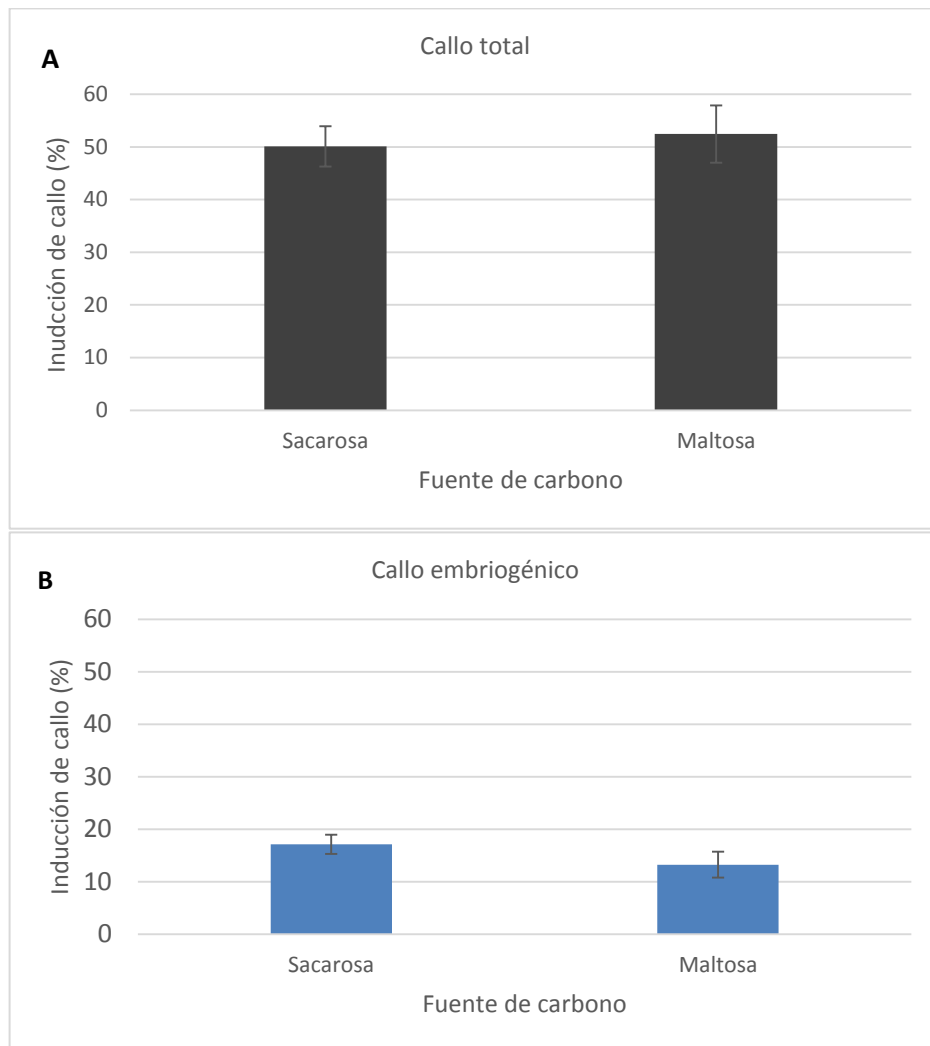


**Figura 20.** Porcentaje de explantes con inducción de callo embriogénico en medios de cultivo con diferentes concentraciones de 2,4-D ( $n = 2,652$ ) **(A)** y cinetina ( $n = 2,652$ ) **(B)** en explantes con corte Tipo 1 de escamas de bulbillos *in vitro* de 3, 21 y 31 meses de edad después de un mes de cultivo. Las barras de error indican el error estándar con respecto a la media.

### 2.5.7 Efecto de la fuente de carbono sobre la inducción de callo.

De manera general, no se observó una diferencia significativa en la inducción de callo total, ni en la de callo embriogénico al cambiar la sacarosa como fuente de carbono por maltosa **(Figura 21)**. La inducción de callo total con maltosa fue de 52,5% con un error estándar de 5,44 y con sacarosa de 50,1% con un error estándar de 3,82 **(Figura 21A)**, mientras que la inducción de callo embriogénico fue 13,3%

con un error estándar de 2,46 para maltosa y 17,4% para sacarosa con un error estándar de 1,84 (**Figura 21B**).



**Figura 21.** Porcentaje de explantes con inducción de callo total ( $n = 2,652$ ) (**A**) y callo embriogénico ( $n = 2,652$ ) (**B**) según la fuente de carbono utilizada, a partir de escamas de bulbillos *in vitro* de 3, 21 y 31 meses de edad, después de un mes de cultivo. Las barras de error indican el error estándar con respecto a la media.

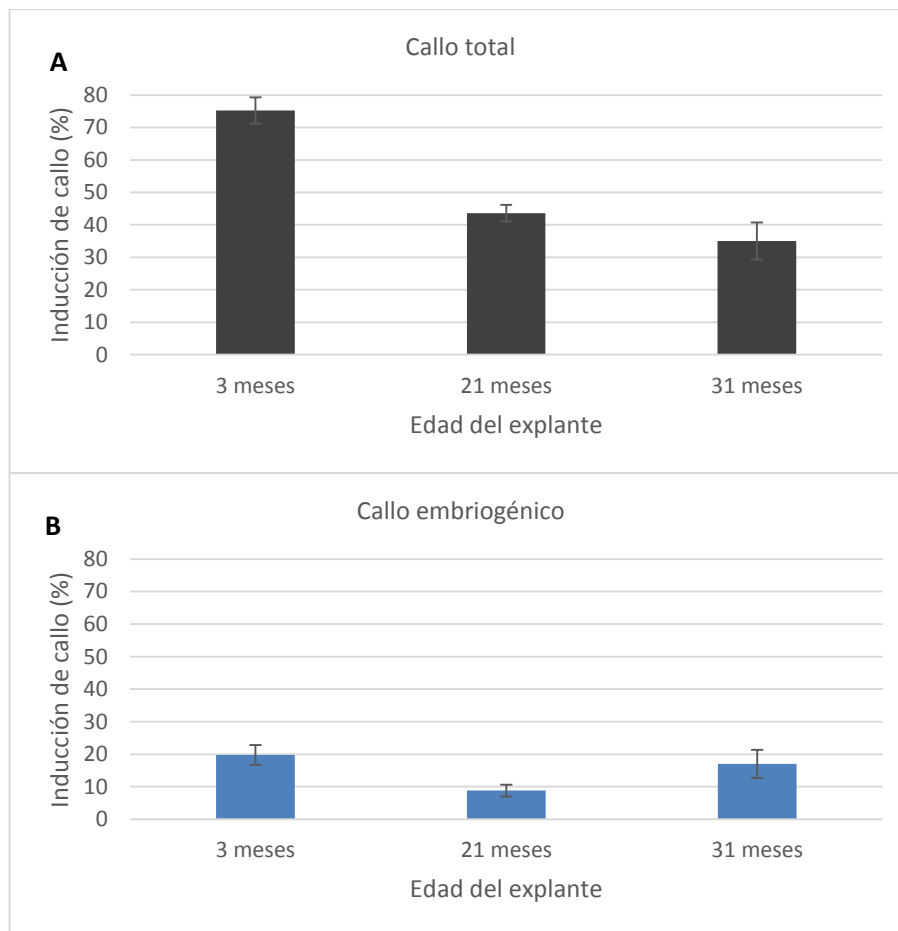
### 2.5.8 Efecto de la edad del explante sobre la inducción de callo.

En cuanto al efecto de la edad del explante sobre la inducción de callo total, se observa una tendencia de mayor respuesta (aproximadamente el doble) en los explantes provenientes de bulbillos más jóvenes (**Cuadro 10, Figura 22A**). En la

medida que aumenta la edad del bulbillo, los explantes muestran una menor respuesta a la formación de callo total. Sin embargo, estas diferencias son significativamente menores en la formación de callo embriogénico ( $p$ : 0,0223) (**Figura 22B**), con excepción de las escamas de bulbillos de 21 meses de edad que mostraron la menor inducción (2 veces menos) respecto a los de 3 meses y 31 meses de edad (**Cuadro 10**).

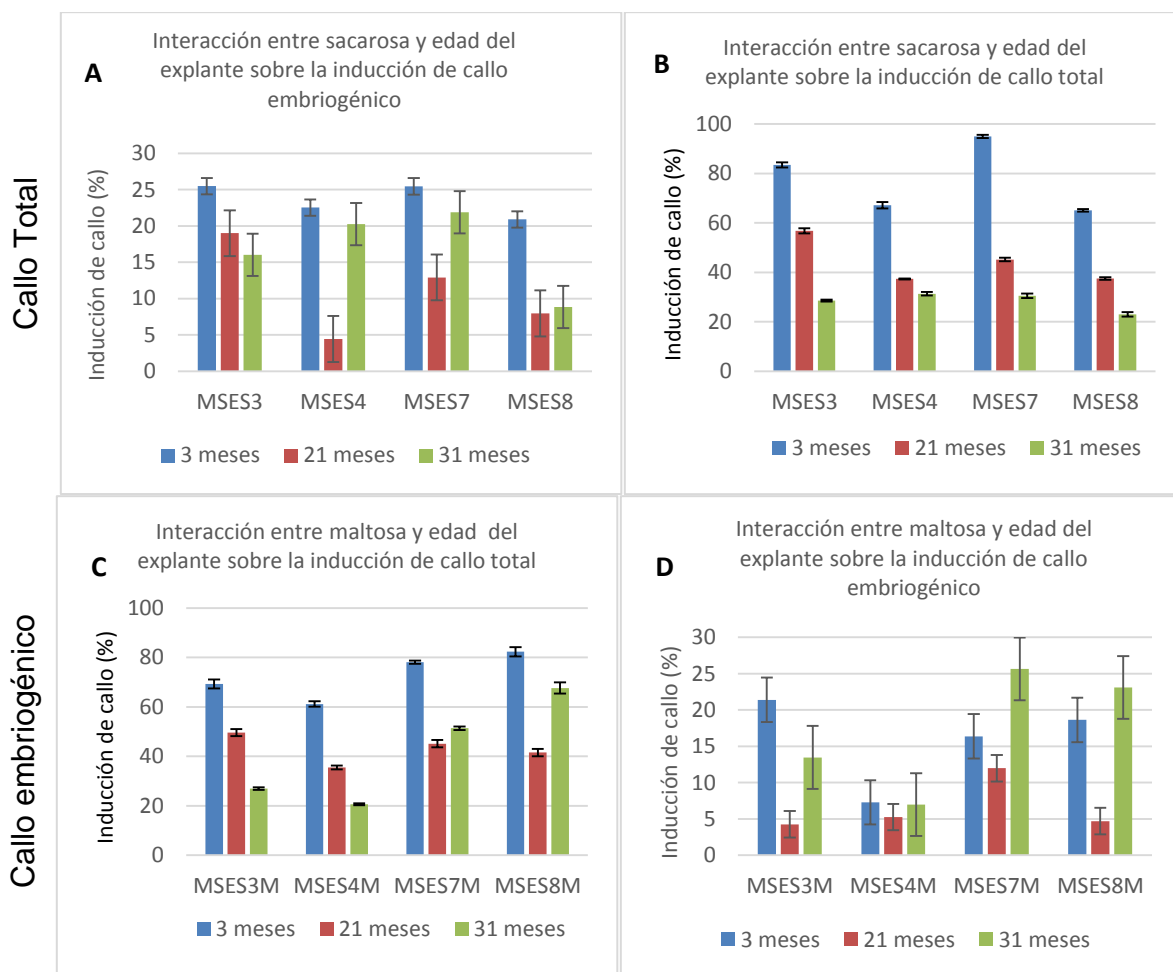
**Cuadro 10.** Efecto de la edad del explante en la formación de callo total y embriogénico en escamas de bulbillos *in vitro* de 3, 21 y 31 meses de edad, después de un mes de cultivo.

Edad del explante (meses)	% Callo Total (error estándar)	# Escamas	% Callo embriogénico (error estándar)	# Escamas
3	75,2 ± 4,04	816	19,8 ± 3,05	792
21	43,6 ± 2,54	520	8,8 ± 1,82	694
31	35,0 ± 5,70	1166	17,0 ± 4,32	1166



**Figura 22.** Porcentaje de explantes con inducción de callo total ( $n = 2,502$ ) (A), y callo embriogénico ( $n = 2,652$ ) (B), a partir de escamas de bulbillos *in vitro* de 3, 21 y 31 meses de edad. Las barras de error indican el error estándar con respecto a la media.

Esta tendencia del efecto de la edad en la inducción de callo se mantuvo independientemente del medio utilizado. En general, las escamas de bulbillos de 3 meses de edad presentan la mayor inducción tanto de callo total como de callo embriogénico independientemente del medio de cultivo y la fuente de carbono utilizada (Figura 22). En los únicos tratamientos donde las escamas de bulbillos de 31 meses de edad presentaron la mayor respuesta fue en callo embriogénico en medios que contenía 1,0 mg/L 2,4-D y maltosa (Figura 23D).



**Figura 23.** Interacción entre el medio de cultivo, la fuente de carbono y la edad de los bulbillos sobre la inducción de callo. (A, C) Inducción de callo total ( $n = 2,502$ ). (A, D) Inducción de callo embriogénico ( $n = 2,652$ ). (A, B) medios con sacarosa

como fuente de carbono. **(C, D)** medios con maltosa como fuente de carbono. Las barras de error indican el error estándar con respecto a la media.

## 2.6 DISCUSIÓN

Uno de los principales problemas en el cultivo de tejidos *in vitro* es la contaminación de los tejidos, especialmente por la presencia de microorganismos en la superficie o en el interior de los tejidos de la planta donante (Castillo, 2004; Abdelnour *et al.*, 2011). Las posibles fuentes de microorganismos asociados con la contaminación son hongos, levaduras y bacterias (Cassells, 1991). En las Amaryllidaceae el proceso de desinfección del tejido madre es sumamente engorroso, por la constante presencia de mucilago, el cual dificulta la eliminación de microorganismos, con resultados poco alentadores cuando no se ha estandarizado un protocolo de desinfección eficaz (Margara, 1988).

Para este trabajo se realizó la desinfección de los bulbos de *Zephyranthes carinata*, provenientes de invernadero, presentando un porcentaje de contaminación del 0% cuando se utilizó el Protocolo 2. La mayor efectividad de éste comparado con el protocolo 1 puede ser producto de la combinación de la solución fungicida-bactericida MERCK TEGO 51 (2%) con el desinfectante hipoclorito de sodio (1,5%) y Extran® MA (50%) como detergente líquido. En conjunto, estos desinfectantes tuvieron un rol importante para la eliminación completa de las bacterias y hongos presentes en el bulbo. El detergente Extran® MA es un tipo de agente microbicida utilizado para la desinfección superficial, no es recomendable utilizarlo en la parte interna de los tejidos vegetales, ya que no tiene un modo de acción de penetración profunda. En contraste el TEGO 51 tiene un efecto comprobado contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos y levaduras encontradas en la profundidad de los tejidos (Aldana & Sarassa, 1999). La disposición de las escamas dentro de los bulbos de la familia Amaryllidaceae deja espacios donde se pueden albergar hongos y bacterias, que no son fácilmente eliminados con el hipoclorito de sodio, principal agente desinfectante en el Protocolo 1. El hipoclorito de sodio es un potente germicida con actividad de amplio espectro, sin embargo, solo afecta a bacterias Gram positivas y Gram negativas no formadoras de esporas. Otros estudios con amarilidáceas reportan protocolos de desinfección donde utilizan otro tipo de soluciones bactericida fungicida (Bedoya & Ríos, 2010; Niño *et al.*, 2005). Sin embargo, los procesos de desinfección reportados son sumamente engorrosos por el largo tiempo requerido para efectuarlos. El Protocolo implementado en este proyecto es simple y efectivo. Este protocolo además de combinar varias soluciones fungicidas y bactericidas, toma en cuenta el tamaño del explante a desinfectar, otro factor que influye en la efectividad de la desinfección total de las escamas provenientes de bulbos de invernadero, ya que mientras más pequeño es el

explante menor el riesgo de contaminación (Castillo, 2004). En este caso, se utilizaron 3 bulbos máximo por vez, de aproximadamente 14 mm de diámetro de ancho, por lote de desinfección.

Se indujeron un total de 98 bulbillos vía organogénesis en el medio MSA1, a partir de 63 twin-scales obtenidos de bulbos del invernadero de *Zephyranthes carinata*. El porcentaje promedio de respuesta de los 2 experimentos realizados fue de 155,6%, es decir que cada twin-scale generó de 1 a 2 bulbillos por explante. Este resultado, es similar a los reportados por el grupo de investigación de biotecnología vegetal de la Universidad Icesi. Tofiño (2017) reportó un porcentaje de respuesta del 152,8%, es decir que cada twin-scale generó 1,5 bulbillos por explante. De igual manera, Chamorro (2016), encontró un porcentaje de respuesta de 117,6%, los twin-scale de bulbos del invernadero generó en promedio 1,2 bulbillos. Estos porcentajes de respuestas, son mayores que los reportados en otras especies de la familia Amaryllidaceae. En un estudio realizado en *Narcissus confusus* se reportó que el porcentaje de inducción bulbillos *in vitro* a partir de callo embriogénico fue del 85% (Sellés, Viladomat, Bastida, & Codina, 1999). Estudios realizados en el género *Hippeastrum* sugieren una inducción de bulbillos del 87% (Vargas, Oropeza & de Garcia, 2006). Cabe mencionar que la variabilidad de respuesta que existe entre los diferentes géneros se cree que puede ser producto de diferencias genéticas, por las condiciones ambientales del invernadero, época del año en el que se recolectan los bulbos y la composición del medio de cultivo, los cuales pueden afectar la capacidad de proliferar nuevos bulbillos, el tiempo de inducción y la capacidad de respuesta a la micro propagación (Alizandre, 2017; Tofiño, 2017).

En relación a la inducción de callo vía embriogénesis somática, este trabajo evaluó dos fuentes del material de partida, escamas obtenidas a partir de bulbos desarrollados en el invernadero, o de bulbillos inducidos y subcultivados *in vitro*. Las escamas provenientes de bulbillos *in vitro* mostraron una mayor inducción de callo, principalmente de callo embriogénico. Estas diferencias pueden deberse a la variabilidad fisiológica de las plantas con las que se trabajó en esta fase, debido a que explantes provenían de bulbillos *in vitro* y bulbos de invernadero. Este tipo de efecto ha sido reportado en otras especies (Sánchez-Calvo *et al.*, 2015). El callo friable Tipo 1 se caracteriza por ser un tejido no organizado, de apariencia vidriosa y translúcida, en comparación con el callo Tipo 2 que resulta ser un tejido no organizado, de apariencia algodonosa y translúcida. Aunque ambos tipos son friables, el callo friable Tipo 2 tiene características importantes, que desde un punto de vista funcional, su irregular crecimiento y mayor friabilidad hace pensar que podría tener potencial para futuros subcultivos. Luego del primer mes de inducción, se observó el inicio de la formación de callo embriogénico a partir de la placa basal. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con el trabajo previo realizado en el grupo de investigación (Tofiño, 2017) y otros estudios reportados en amarilidáceas (Sage *et al.*, 2000; Bedoya & Ríos, 2010). Tofiño (2017) también reporta la formación de callo a partir de la placa basal luego de dos semanas de cultivo. De igual manera, Bedoya & Ríos (2010) indican que los explantes



provenientes de los cormos internos de la parte basal del bulbo respondieron mejor a todos los tratamientos ensayados, con una formación de callos friables del 34% al mes de cultivo. Se ha demostrado que estas zonas del bulbo son las más totipotentes y por consiguiente promueven la inducción de callos y embriones somáticos (Sage *et al.*, 2000).

Al comparar los callos friables y embriogénicos obtenidos en este trabajo con otros estudios de la familia Amaryllidaceae, se encuentran similitudes asociados a su morfología y tiempo de inducción *in vitro*. En el caso de Selles & Codina (1999), obtuvieron callos friables y embriogénicos. Los callos friables eran de apariencia aguada y mantenidos mediante subcultivos cada 4 semanas, sin embargo, no mostraron ningún tipo de crecimiento. Mientras que los callos embriogénicos eran de apariencia amarilla, compactas y granulares. Sage (2005), solamente obtuvo masas grandes de callos nodulares de color amarillo y blanco cuando utilizaba elevadas concentraciones de auxina (picloram) y bajas concentraciones de citoquinina, con el fin de lograr la regeneración de bulbillos *in vitro* mediante embriogénesis somática. Finalmente, Niño (2010) obtuvo tanto callo friable como callo embriogénico mediante medios MS suplementados con 2,4-D y cinetina. Los callos friables que obtuvieron presentaron las mismas características morfológicas al tener una estructura desorganizada y aguada, en comparación con los embriogénicos cuyas estructuras mostraron ser brotes globulares, amarillos y compactos. La morfología de callos documentados para este trabajo también concuerda con los observados por Tofiño (2017). La formación de tejido no organizado, de apariencia gelatinosa y traslucida es considerada callo friable. Estas células son capaces de dividirse o de transformarse en embriones somáticos según las condiciones del medio de cultivo (Yeung, 1995). Sin embargo, no se ha documentado la formación de embriones a partir callo friable para la familia Amaryllidaceae. Ahora bien, a diferencia de Tofiño (2017) no se realizó una clasificación para callo pre-embriogénico. Simplemente todo callo que presentara formación de tejido nodular y organizado de coloración amarillo claro fue descrito como callo embriogénico

Los resultados obtenidos sugieren que la inducción y el tipo de callo formado dependen del origen del material. Los explantes obtenidos a partir del material *in vitro* respondieron mejor en comparación a los provenientes de invernadero. Sin embargo, la mayor diferencia se observó en la inducción de callo embriogénico. La inducción de callo embriogénico también resultó mayor para las escamas *in vitro* respecto a los escamas del invernadero. En este trabajo se decidió comparar estas dos fuentes del material vegetal de partida, debido a que trabajos realizados anteriormente en el laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad Icesi sugieren que este factor puede afectar el nivel de respuesta *in vitro* (Chamorro, 2016; Tofiño, 2017). Chamorro (2016) observó que las escamas de bulbillos *in vitro* tienen una mayor respuesta vía organogénesis induciendo un mayor número de bulbillos por escamas, que aquellas provenientes del invernadero. Tofiño (2017) a su vez, obtuvo un porcentaje de respuesta más alto para la formación de callo en los

explantes obtenidos a partir de bulbillos *in vitro*, pero sólo el 27,2% generó callo embriogénico en comparación con el 60,9% de inducción de callos embriogénicos generados de explantes de bulbos de invernadero. Tofiño sugiere que esta menor inducción de callo embriogénico puede ser debido a la edad y mantenimiento de los bulbillos *in vitro*. Hay otros estudios que sugieren que la edad del explante puede influenciar la embriogénesis somática (Badawy et al., 2005) puesto que los tejidos más indiferenciados y los más jóvenes por lo general presentan una mayor respuesta (Castillo, 2004).

En relación al tipo de corte de los explantes, se observó que el corte tipo 2 genera mayor inducción de callo total y de callo embriogénico que el corte tipo 1. Estas diferencias se mantienen, indistintamente de la procedencia del material vegetal, *in vitro* o de invernadero. Adicionalmente, el material *in vitro* muestra 4 veces más inducción de callo embriogénico que el correspondiente del invernadero. Un estudio realizado por Padilla *et al.* (2016) evaluó la propagación de plantas del género *Zephyranthes*. En ese estudio se evaluaron seis diferentes tipos de incisiones realizadas al bulbo, para obtener los explantes a partir de las escamas del bulbo. Los resultados indicaron que hay un incremento en la formación de bulbillos conforme el número de cortes de la placa basal aumentó. Es posible que el corte en la placa basal genere un estímulo artificial, y dependiendo del tipo de corte, se induce la formación de bulbillos o callo (Padilla *et al.*, 2016). En cuanto a la formación de bulbillito, esto es debido a que las heridas causadas al bulbo inducen la reacción de las yemas axilares a través de un mecanismo hormonal. Una posible explicación de los resultados obtenidos en este trabajo, es que al realizar el corte tipo 2 se obtiene un mayor número de secciones que tienen placa basal. Es decir, las secciones basales al tener mayor contacto con el medio de cultivo absorberán nutrientes permitiendo mayor inducción de callo embriogénico sobre la superficie del explante (Castillo, 2004); lo que confirma nuevamente la totipotencia de la placa basal. De otro lado, este tipo de corte facilita la manipulación de los explantes, evitando menor daño mecánico de la placa basal debido al menor contacto entre la cuchilla y la pinza en el momento de la siembra de los explantes en el medio de cultivo. Lo contrario ocurre cuando se realiza el corte tipo 1, ya que con este tipo de corte se obtienen cuatro secciones iguales de mayor tamaño que superan los 7 mm de diámetro de ancho, por lo que es necesario realizarle al tejido más cortes longitudinales, con el fin de proporcionar explantes pequeños de aproximadamente 4 mm de ancho de diámetro. El tamaño del explante es clave en el momento de la inducción de callo ya que puede afectar la respuesta embriogénica (Castillo, 2004). En general, los tamaños más pequeños responden mejor ante los diferentes tratamientos, probablemente porque existe una mayor cantidad de células expuestas al medio de cultivo, lo cual provoca un mayor estrés que fomenta el metabolismo celular (Fehér *et al.* 2003). Sin embargo, en este trabajo se observó que explantes menores de 4 mm de diámetro presentan una mayor oxidación u oscurecimiento de los tejidos cultivados *in vitro*, fenómeno conocido como fenolización, lo que resulta en la muerte del tejido vegetal (Azofeifa, 2009).

Después de comparar y seleccionar la procedencia de la fuente de partida y determinar el tipo de corte para optimizar el desarrollo de callo embriogénico en *Zephyranthes carinata*, se procedió a determinar el efecto del 2,4-D y la cinetina en dos concentraciones diferentes cada una. De acuerdo a los resultados, se observó una tendencia de mayor inducción de callo embriogénico en los explantes provenientes de 1,0 mg/L de 2,4-D respecto a 0,4 mg/L 2,4-D. Usualmente las concentraciones que se utilizan en el medio de cultivo suele ser baja para citoquinina, en comparación con la auxina que es más alta para especies bulbosas (Niño, 2007; Bedoya & Ríos, 2010 Mujib, 2013). Mujib (2013) reporta la formación de embriones somáticos a las seis semanas de inducción utilizando 1,0 mg/L de 2,4-D en la especie *Crinum asiaticum*, especie bulbosa de la familia Amaryllidaceae. De igual manera, Niño (2007), observó embriones somáticos globulares a los 41 días de cultivo en la especie *Crinum powellii* empleando 1,0 mg/L de 2,4-D. Por último, Bedoya & Ríos (2010) reportaron inducción de embriones somáticos con esta misma concentración de auxina al mes y medio de cultivo. Por otro lado, Hu & Wang (1983) reportan que en el 85% de los medios de cultivo utilizan citoquininas para el cultivo *in vitro* en general. La segunda citoquinina más empleada es la cinetina (23%) (Castillo, 2004). Por lo general, los reportes sobre inducción de callos en la familia Amaryllidaceae, mantiene un balance entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo donde la proporción de auxinas usualmente es mayor al de citoquininas (Castillo, 2004). En este estudio, la mayor inducción de callo embriogénico se obtuvo en los medios donde la proporción auxina: citoquina fue de 2,5 (1,0 mg/L 2,4-D: 0,4 mg/L cinetina) seguido de la proporción auxina: citoquina de 1,0 (0,4 mg/L 2,4-D: 0,4 mg/L cinetina). Los niveles de inducción de callo embriogénico se redujeron cuando la concentración de citoquina se incrementó 1,5 veces respecto al de la auxina (1,0 mg/L 2,4-D: 1,5 mg/L cinetina), y la menor inducción se registró cuando la proporción de citoquina se elevó 3,75 veces más en el medio M4, (0,4 mg/L 2,4-D: 1,5 mg/L cinetina). El balance reportado en un estudio realizado para *Crinum x powellii* "álbum", especie de Amaryllidaceae, obtuvo callos embriogénicos al utilizar una proporción auxina: citoquina de 1,0 (0,4 mg/L 2,4-D y 0,4 mg/L cinetina) (Niño, 2010). Se puede observar una diferencia de 1,5 respecto a los balances dados para este estudio y el de Niño (2010). Según Litz, 1984 y Dhed'a et al, 1991, un factor a considerar es que muchas veces dentro de una especie o familia, las reacciones de las diferentes variedades pueden ser diferentes. Así, un método establecido para una especie podrá no aplicarse a otro individuo de la misma especie. De esta manera, el estado de desarrollo de la planta madre, el tamaño, los cortes que sufre el explante y la edad fisiológica son de gran influencia para el éxito de dicho cultivo.

En el cultivo de tejidos *in vitro*, se necesita una fuente de carbono para proporcionar la energía necesaria para el proceso de embriogénesis somática (Steven, King & Kasha, 1994). Por lo general, la sacarosa es el carbohidrato más utilizado y estándar (3%) para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Evans *et al.*, 1981, Dunwell, 1985, Strickland *et al.*, 1987). La sacarosa (disacárido de glucosa – fructosa) se hidroliza rápidamente en el medio de cultivo, producto de la acción de sacarosa invertasa

liberada por los tejidos, produciendo glucosa y fructosa, e incrementado la osmolalidad del medio a los 3 días de cultivo; después de este periodo, no se detecta sucrosa en el medio (Last y Brettell, 1990; Steven, King & Kasha, 1994). Es por esto que se han estudiado otras fuentes de carbono, en particular para la inducción de la embriogénesis somática en plantas (Brown *et al.*, 1995). A diferencia de la sacarosa, la maltosa (un disacárido de glucosa), es hidrolizada lentamente durante el cultivo *in vitro*, por tanto durante los primeros 21 días, el azúcar predominantemente en el medio sigue siendo la maltosa, manteniendo más estable el potencial osmótico del medio, antes que los subproductos derivados de la hidrólisis (Roberts, O. Dunwell, J.M. 1990). En el caso de las Amaryllidaceae, no existe documentación donde reporten el uso de maltosa como fuente de carbono para inducir embriogénesis somática. Sin embargo, se ha demostrado la eficacia de la maltosa como fuente de carbono para la embriogénesis somática en otras especies como petunia (Raquin, 1983), alfalfa (Strickland *et al.*, 1987), pino (Nagmani *et al.*, 1993), guisante (Loiseau *et al.*, 1995) y manzana (Daigny *et al.*, 1996). Además, la maltosa se ha utilizado para mejorar la maduración del embrión somático en el cacao (López-Baez *et al.*, 1993) y el pino (Li *et al.*, 1998). En este trabajo de manera general, no se observó una diferencia en la inducción de callo total, ni en la de callo embriogénico al cambiar la sacarosa como fuente de carbono por maltosa.

Al evaluar el efecto de la edad del explante sobre la inducción de callo total, en *Zephyranthes carinata*, se observa una tendencia de mayor respuesta en los explantes provenientes de bulbillos más jóvenes. En la medida que aumenta la edad del bulbillito, los explantes muestran una menor respuesta a la formación de callo total. En cuanto a la inducción de callo embriogénico, se observó mayor respuesta en los bulbillos jóvenes de 3 meses de edad. Como se mencionó anteriormente, esta respuesta se debe a que la edad del explante tiene un rol importante en la determinación de la respuesta *in vitro* para embriogénesis somática (Castillo, 2004). En base a la definición de totipotencia, todo tejido *in vitro* tiene la capacidad para formar embriones somáticos. Sin embargo, dependiendo de la edad del explante y de las condiciones de cultivo, pocos explantes son capaces de iniciar la embriogénesis somática (Freire-Seijo, 2003). En general, de acuerdo a estos resultados se puede inferir que entre más joven es el tejido utilizado como explantes en Amaryllidaceae (estadio juvenil poco diferenciado) más fácil es reprogramar el proceso de diferenciación e inducir la desdiferenciación del tejido hacia la formación de embriogénesis somática (Blasco, 2013). Además, se debe tener en cuenta que los bulbillos *in vitro* de 3 meses presentaron un tamaño de aproximadamente 4 mm de diámetro, lo que pudo afectar la respuesta embriogénica. En general, los tamaños más pequeños responden mejor ante los diferentes tratamientos, probablemente porque existe una mayor cantidad de células expuestas al medio de cultivo, lo cual provoca un mayor estrés que fomenta el metabolismo celular (Fehér *et al.* 2003). Sin embargo, esto no siempre se aplica ya que en el caso particular del cultivo de tejidos *in vitro*, los cortes que sufre el explante o incluso el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante ocasionan

procesos de oxidación en el tejido. El seccionamiento de los explantes hasta alcanzar tamaños pequeños, permitiría que una mayor cantidad de células perivasculares se encuentren en contacto con los componentes del medio de cultivo y, por tanto, respondan con mayor facilidad.

El estudio realizado permite entender mejor los parámetros que afectan la embriogénesis somática en *Zephyranthes carinata*, para en un futuro optimizar la producción de embriones somáticos a gran escala para la producción de alcaloide por medio de un biorreactor. Con base a los resultados de este trabajo, las mejores condiciones para lograr mayor inducción de callo embriogénico consisten en utilizar material vegetal joven, preferiblemente los bulbillos *in vitro* utilizados como material de partida para obtener las escamas como explantes, deben tener un tamaño entre los 9-14 mm de diámetro. Además, es importante generar los explantes utilizando el corte Tipo 2 ya que de esta forma se podrán obtener explantes del tamaño adecuado para la siembra, sin ocasionar daño mecánico a la placa basal. Finalmente, los explantes preferiblemente deben sembrarse en un medio de cultivo que contenga 1,0 mg/L 2,4-D y 0,4 mg/L cinetina, suplementado con sacarosa al 3%.

Este es el primer reporte donde se establece un protocolo para la inducción de callo embriogénico en *Zephyranthes carinata*. Aunque la embriogénesis somática de diferentes especies pertenecientes a esta familia ha sido estudiado ampliamente a nivel mundial (Ptak et al., 2013; Selles & Codina, 1999; Saghi et al., 2007; Sage et al., 2005; Ptak et al., 2010; Mujib et al., 2013; Niño et al., 2010; Sage & Hammatt et al., 2005; Bedoya & Ríos., 2010; Alizandre, 2017), son pocos los estudios enfocados a la especie *Zephyranthes carinata* (Tofiño, 2017). Este trabajo documenta una evaluación integral de los principales factores que pueden afectar la embriogénesis somática en *Zephyranthes carinata*. Sin embargo, aún se requiere optimizar el sistema para obtener una proliferación masiva de callo embriogénico que pueda ser escalable en un futuro en sistemas de inmersión temporal o biorreactores, conjuntamente con tratamientos de inductores químicos que estimulen la producción y liberación de alcaloides de interés al medio líquido, lo que facilitaría su extracción, purificación y uso. Adicionalmente, la embriogénesis somática podría ser utilizada como método de conservación de germoplasma, si se combina con la producción de semilla artificiales y crioconservación (Freire-Seijo, 2003), o para la regeneración de plántulas *in vitro* que podría contribuir en la repoblación de zonas afectadas, conservando la biodiversidad de especies de amarilidáceas nativas y amenazadas, sin afectar su distribución en ambientes naturales. A pesar de que la maltosa no presentó una mayor respuesta de inducción de callo embriogénico, sería interesante no descartar totalmente esta fuente de carbono sin antes realizar ensayos con diferentes concentraciones.

## 2.7 Conclusiones

1. Se estableció un protocolo de desinfección adecuado para la inducción de explantes *in vitro* en *Zephyranthes carinata* con un porcentaje de 0% de contaminación.
2. Se obtuvo vía organogénesis una inducción de 1 a 2 bulbillos por explante de twin-scale en *Zephyranthes carinata*.
3. Los callos inducidos en *Zephyranthes carinata* a partir de escamas de bulbos de invernadero o bulbillos *in vitro* fueron callos friables y embriogénicos. Los callos friables se caracterizaron por un crecimiento desorganizado y apariencia traslucida, mientras que los callos embriogénicos se caracterizaron por la formación de estructuras organizadas, compactas, de aspecto nodular, y de coloración amarilla.
4. A las 2 semanas de cultivo se observó el inicio de inducción de callo friable en los explantes cultivados, y a las 4 semanas el inicio de callo embriogénico.
5. El corte óptimo para la inducción de embriogénesis somática en *Zephyranthes carinata* es el tipo 2, aparentemente este tipo de corte reduce el daño mecánico en la manipulación de la placa basal y aumenta la exposición de los explantes al medio de cultivo.
6. Fue posible optimizar el protocolo para la inducción de callos embriogénicos hasta un 17% independientemente de la edad del tejido.
7. La edad del tejido influye en la embriogénesis somática de *Zephyranthes carinata*, ya que se observó que a los 3 meses se obtiene de manera consistente la mayor inducción de callo embriogénico.
8. A medida que aumenta la edad del explante disminuye la respuesta de inducción del callo total.
9. En cuanto a la concentración de la auxina 2,4-D, se observó una mayor respuesta de callo embriogénico a 1,0 mg/L, en los explantes provenientes de bulbillos *in-vitro*. Esta concentración también fue óptima independiente de la edad del explante.
10. En cuanto a la concentración de la cinetina, se observó una mayor respuesta de callo embriogénico a 0,4 mg/L, en los explantes provenientes de bulbillos

*in-vitro*. Esta concentración también fue óptima independiente de la edad del explante.

11. El medio MSES7 el cual contiene 1,0 mg/L de 2,4-D y 0,4 mg/L de cinetina, fue el que indujo la mayor inducción tanto de callo total como de embriogénico. Los resultados sugieren que esta es la mejor combinación y concentración de fitoreguladores, con una proporción de 2,5: 1 auxina: cinetina.
12. Se observó una mayor inducción de callo embriogénico cuando se utiliza sacarosa como fuente de carbono.
13. Los explantes provenientes de bulbos de invernadero o bulbillos *in vitro* deben tener como mínimo un diámetro de 4 mm de ancho para evitar una muerte prematura de los tejidos en cultivo para inducir callos.
14. Las metodologías utilizadas en este trabajo son reproducibles ya que las muestras fueron representativas, y los resultados obtenidos tienen un error estándar muy bajo, lo que aumenta la precisión de los datos hallados.

## 2.8 Recomendaciones

Se recomienda tomar del invernadero bulbos que no superen los 14 mm de diámetro, ya que almacenan sustancias mucilaginosas provocando mayor riesgo de contaminación *in vitro*.

Para el proceso de desinfección de los bulbos provenientes de invernadero, se recomienda mantener la proporción de 3 bulbos de 14 mm de diámetro en un volumen de 200 mL de solución desinfectante, ya que usar mayor número de bulbos por lote de desinfección puede disminuir el efecto en la desinfección.

Para la inducción de callo a partir de escamas de bulbillos *in vitro*, se recomienda utilizar bulbillos cuyo tamaño sea de aproximadamente 9 mm de diámetro. Esto permitirá un manejo más fácil del tejido, lo que evitará daño mecánico a la placa basal.

Para el tipo de corte, se podría evaluar el corte tipo 2 para la inducción de bulbillos vía organogénesis, ya que podría aumentar la tasa de inducción de bulbillos *in vitro*.

Aunque en este estudio no se pudo apreciar un efecto inductivo de la maltosa, se recomienda evaluarla nuevamente a concentraciones mayores del 3%, ya que otros

estudios han comprobado un efecto positivo en la embriogénesis somática de otras especies de Amaryllidáceae.

Se recomienda continuar las investigaciones en la embriogénesis somática de *Zephyranthes carinata*, enfocadas en identificar el medio adecuado para inducir la proliferación del callo embriogénico obtenido en un menor tiempo, ya que hasta el momento no se han observado cambios en proliferación de los callos obtenidos en la etapa 1.

Por último, es importante seguir optimizando el protocolo de embriogénesis somática en *Zephyranthes carinata* ya que sería ideal encontrar un medio de cultivo que induzca la producción masiva y proliferación de callo embriogénico. Esto permitirá el cultivo de estos tejidos en biorreactores para la eventual producción de alcaloides a gran escala, además, de permitir la multiplicación y conservación de amarilidáceas en condiciones *in vitro*, tanto por medio de regeneración de plantas vía embriogénesis, como la producción de semillas artificiales para la conservación a largo plazo en criopreservación.



### 3 Bibliografía

Abdelnour Esquivel, A., & Escalant, J. V. (1994). Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales, p.7-29

Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99: 35-45.

Aldana, L y Sarassa, S. 1999. Efecto de desinfectantes y antimicrobianos naturales frente a capas de *Listeria monocytogenes*. Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá. Colombia, p. 21

Alizandre, D. (2017). Evaluación del efecto de metil jasmonato y ácido jasmonico en la liberación de alcaloides producidos *in vitro* en *Zephyranthes carinata*. Proyecto de Grado Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Icesi. Pp: 33

Anbari, S., Tohidfar, M., Hosseini, R., & Haddad, R. (2007). Somatic embryogenesis induction in *Narcissus papyraceus* cv. Shirazi. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 17(1), 37-46.

Asemota, O., Eke, C. R. and Odewale, J. O. 2007. Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro* morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen. *African Journal of Biotechnology* 6: 2353-2357

Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana*, 20(1), p. 153-167

Bach, A., & Sochacki, D. (2012). Propagation of Ornamental Geophytes, Physiology and I Systems. In R. Kamenetsky & H. Okubo (Eds.), *Ornamental Geophytes: From Basic Science to Sustainable Production* (pp. 261–278).

Badawy, E. M., Habib, A. M. A., El-Bana, A. and Yosry, G. M. 2005. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera*) plants by using tissue culture technique. *Arabian Journal of Biotechnology* 8: 343-354.

Balandrin, M. F., & Klocke, J. A. (1988). Medicinal, aromatic, and industrial materials from plants. In *Medicinal and Aromatic Plants I* (pp. 3-36). Springer Berlin Heidelberg.

Bedoya Perdomo, C., & Ríos Ríos, A. M. (2010). *Inducción de la embriogénesis somática en Crinum x powellii* "onfu" (Amaryllidaceae) (Bachelor's thesis, Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira), p.14-47.

Benson, E. E. 2000. In vitro plant recalcitrance: An introduction. In *Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 36: 141-148.

Blanc, G., Michaux-Ferrière, N., Teisson, C., Lardet, L., & Carron, M. P. (1999). Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59(2), 103-112.

Blasco Carlos, M. (2013). Aplicaciones de la embriogénesis somática para la propagación y mejora de *Quercus ilex* L. y *Pinus* spp, p. 21.

Brown, D. C., Finstad, K. I., & Watson, E. M. (1995). Somatic embryogenesis in herbaceous dicots. In *In vitro embryogenesis in plants*. Springer Netherlands, p. 345-415.

Cahlíková, L., Valterová, I., Macáková, K., & Opletal, L. (2011). Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC/MS and their cholinesterase activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(4), p. 575-580.

Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Uruguay*, p.21-53.

Daigny, G., Paul, H., Sangwan, R. S., & Sangwan-Norreel, B. S. (1996). Factors influencing secondary somatic embryogenesis in *Malus x domestica* Borkh.(cv 'Gloster 69'). *Plant cell reports*, 16(3-4), 153-157.

De Fera, M (2000) Empleo de biorreactores para la multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas de *Coffea arabica* L. cv. Catimor 9722. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV. Santa Clara, p. 51.

Dhed'a, D.; Dumortier, F.; Panis, B.; Vuylsteke, D.; De Langhe, E. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. 'Bluggoe' (*Musa* spp. ABB group). *Fruits* 46: 125-135

Dunwell JM (1985) Anther and ovary culture. In: Bright SWJ & Jones MGK (Eds) *Cereal Tissue and Cell Culture*. (pp 1–44). Nijhoff ISBN-90-247-3190-9

Elgorashi, E. E., Drewes, S. E., Morris, C., & van Staden, J. (2003). Variation among three *Crinum* species in alkaloid content. *Biochemical systematics and ecology*, 31(6), 601-615.

Evans DA, Sharp WR & Flick CE (1981) Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. In: Thorpe TA (Ed) *Plant Tissue Culture* (45 p.). Academic Press, NY

Fehér, A., Pasternak, T. P. and Dudits, D. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 201-228.

Freire-Seijo, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología vegetal*, 3(4).

Gueye, B., Morcillo, F., Collin, M., Gargani, D., Overvoorde, P., Aberlenc-Bertossi, F., ... & Verdeil, J. L. (2009). Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2, 4-D treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 99(1), 35-45.

Huang, C. W., Okubo, H., & Uemoto, S. (1990). Importance of two scales in propagating *Hippeastrum hybridum* by twin scaling. *Scientia Horticulturae*, 42(1-2), 141-149.

Jiménez, V. M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation* 47: 91-110.

Krishnaraj, S., & Vasil, I. K. (1995). Somatic embryogenesis in herbaceous monocots. In *In Vitro embryogenesis in plants* (pp. 417-470). Springer Netherlands.  
Li, X. Y., Huang, F. H., Murphy, J. B., & Gbur, E. E. (1998). Polyethylene glycol and maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 34(1), 22-26.

Li, X.Y. and Huang, F.H. 1996. Induction of somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 32 (3): 129-135

Litz, R. E., Knight, R. J., & Gazit, S. (1984). In vitro somatic embryogenesis from *Mangifera indica* L. callus. *Scientia horticulturae*, 22(3), 233-240.

Loiseau, J., Marche, C., & Le Deunff, Y. (1995). Effects of auxins, cytokinins, carbohydrates and amino acids on somatic embryogenesis induction from shoot apices of pea. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 41(3), 267-275.

López F.A.R. and Espejo S.A (2002). Flora de Veracruz: Amaryllidaceae. Fascículo 128, 36 p.

Lopez-Baez, O., Bollon, H., Eskes, A., & Pétiard, V. (1993). Embryogénese somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. à partir de pièces florales. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie*, 316(6), 579-584.

Margara, J. 1988. "Multiplicación vegetativa y cultivo. Los meristemos y la organogénesis". Madrid: Ediciones MundiPrensa, p.26-54.

- Meerow, A.W. & Snijman, D. 1998. Amaryllidaceae. In K. Kubitzki (ed.) The families and genera of flowering plants III: Liliaceae (except Orchidaceae). Berlin, Springer-Verlag, p. 83-110.
- Mujib, A., Banerjee, S., Maqsood, M., & Ghosh, P. D. (2013). Somatic embryogenesis of some member ornamental genera of Amaryllidaceae and allied families: the similarities and differences. *The Open Horticulture Journal*, 6(1).Mundo Científico. 7(71): 730-736
- Nagmani, R., Diner, A. M., & Sharma, G. C. (1993). Somatic embryogenesis in longleaf pine (*Pinus palustris*). *Canadian Journal of Forest Research*, 23(5), 873-876.
- Nordstrom, A., Tarkowski, P., Tarkowska, D., Norbaek, R., Åstot, C., Dolezal, K., & Sandberg, G. (2004). Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated development. *The National Academy of Sciences of the USA*, 8039–8044.
- Ochoa-Villarreal, M., Howat, S., Jang, M. O., Kim, I. S., Jin, Y. W., Lee, E. K., & Loake, G. J. (2015). Cambial meristematic cells: a platform for the production of plant natural products. *New biotechnology*, 32(6), 581-587.
- Osorio, J. N., Ríos, A. M., Bedoya, C., & Martínez, O. M. M. (2010). Inducción de la embriogénesis somática a partir de cormos de *Crinum x powellii* "álbum"(Amaryllidaceae). *Scientia et 68onfuses68*, 3(46), 113-118.
- Padilla-Sánchez, A., Rodríguez, M. A., Alia-Tejacal, I., Villegas-Torres, Ó. G., & Guillen-Sánchez, D. (2016). PROPAGACIÓN VEGETATIVA Y SEXUAL DE MAYITO (*Zephyranthes fosteri* TRAUB y *Z. lindleyana*). *Acta Agrícola y Pecuaria*, 2(2), 34-42.
- Perera, P. I. P., Vidhanaarachchi, V. R. M., Gunathilake, T. R., Yakandawala, D. M. D., Hoher, V., Verdeil, J. L. and Weerakoon, L. K. 2009. Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99: 73-8
- Ptak, A. (2010). Somatic embryogenesis in in vitro culture of *Leucojum vernum* L. *Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants*, 223-233.
- Ptak, A., Simlat, M., Kwiecień, M., & Laurain-Mattar, D. (2013). *Leucojum aestivum* plants propagated in in vitro bioreactor culture and on solid media containing cytokinins. *Engineering in Life Sciences*, 13(3), 261-270.

Ptak, A., Tahchy, A., Skrzypek, E., Wójtowicz, T., & Laurain-Mattar, D. (2013). Influence of auxins on somatic embryogenesis and alkaloid accumulation in *Leucojum aestivum* callus. *Open Life Sciences*, 8(6), 591-599.

Rangel-Ch, J. O. (2015). La biodiversidad de Colombia: significado y distribución regional. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 39(151), 176-200.

Raquin, C. (1983). Utilization of different sugars as carbon source for in vitro anther culture of *Petunia*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 111(5), 453-457.

Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. A., & Verde-Star, M. J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. OmniaScience, p. 351-358.

Roberts, O. Dunwell, J.M. 1990. Changes in the sugar content of barley anther during culture on different carbohydrates. *Plant Cell Tissue Organ. Cult* 22: 77-85

Sage, D. O. (2004). Propagation and protection of flower Bulbs: Current approaches and future prospects, with special reference to *Narcissus*. In *IX International Symposium on Flower Bulbs* 673 (pp. 323-334).

Sage, D., & Hammatt, N. (2000, August). Somatic embryogenesis and transformation in *Narcissus pseudonarcissus* cultivars. In *VIII International Symposium on Flowerbulbs* 570 (pp. 247-249).

Sánchez, F. O., Sánchez, R. H., & Zabala, M. E. A. (2002). Cultivo de células vegetales en biorreactores: un sistema potencial para la producción de metabolitos secundarios. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 55(1), 1473-1495.

Sánchez-Calvo, L., & Alvarenga-Venutolo, S. (2015). Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC (uña de gato). *Revista Tecnología en Marcha*, 28(1), 105-120.

Scott, P., & Lyne, R. L. (1994). The effect of different carbohydrate sources upon the initiation of embryogenesis from barley microspores. *Plant cell, tissue and organ culture*, 36(1), 129-133.

Segretín, M. E. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). *Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología*, p.1-6.

Selles, M., Viladomat, F., Bastida, J., & Codina, C. (1999). Callus induction, somatic embryogenesis and organogenesis in *Narcissus* 69onfuses: correlation between the state of differentiation and the content of galanthamine and related alkaloids. *Plant Cell Reports*, 18(7-8), 646-651.

- Silverstone Sopkin, P. A. (2011). Los muertos vivos: la historia natural de cuatro lirios amazónicos del suroccidente de Colombia. *Programa Editorial, Universidad del Valle, Cali, Colombia*. 100p.
- Simpson, M. G. (2010). *Plant systematics*. Academic press, p. 169-170
- Singh B and Katoch D. Phytochemistry and Pharmacology of Genus *Zephyranthes*. *Med Aromat Plants*. 2015; 4:212.
- Steinmacher, D. A., Clement C. R. and Guerra, M. P. 2007a. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 89: 15-22.
- Steven, P. King & Ken J. Kasha. 1994. In vitro androgenesis in seed plants: Anther and isolated microspore culture in barley (*Hordeum vulgare* L.). p. 105-110
- Strickland SG, Nichol JW, McCall CM & Stuart DA (1987) Effect of carbohydrate source on alfalfa embryogenesis. *Plant Sci*. 48: 113–121
- Tisserat, B., E.B. Esan, and T. Murashige.1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. *Horticultural Reviews* 1: 1-78.
- Tofiño, M.C. (2017). Optimización de la producción de alcaloides en *Zephyranthes carinata* por medio de Organogénesis o Embriogénesis Somática *in vitro*. Proyecto de Grado Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Icesi. Pp: 50
- Vargas, T. E., Oropeza, M., & de García, E. (2006). Propagación in vitro de *Hippeastrum* sp. *Agronomía Trop*, 56(4), 621-626.
- Viñas, M., & M Jiménez, V. (2011). Factors affecting in vitro somatic embryogenesis of palms (Arecaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 229-242.
- Wanderley, M. D. G. L., Shepherd, G. J., Melhem, T. S. A., Giulietti, A. M., Martins, S. E., & Kirizawa, M. (2005). *Flora fanerogâmica do estado de São Paulo* (Vol. 4). RiMa, p. 244-256
- Yeung, E. C. (1995). Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In *In vitro embryogenesis in plants* (pp. 205-247). Springer Netherlands.
- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 23(4), 283-333.



## 4 Anexos

### **Anexo 1.** Protocolo 1 (Desinfección superficial del material de invernadero)

El protocolo de esterilización del material de invernadero fue estandarizado en el Laboratorio de Investigación en Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi. (Restrepo, 2016).

1. Retirar hojas, raíces y escamas viejas y/o secas que pueda presentar el bulbo.
2. Lavar el bulbo con agua potable y jabón con el objetivo de retirar la tierra.
3. Llevar material a la cabina de flujo laminar y sumergirlo en Etanol al 70% durante 1 minuto.
4. Cortar el bulbo longitudinalmente en 4 partes iguales incluyendo placa basal.
5. Sumergir en Etanol al 70% por 1 minuto.
6. Sumergir en Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 1,5% por 20 minutos con agitación constante.
7. Por cada 100 ml de NaOCl, adicionar 4gotas / 100ml de Tween 20.
8. Enjuagar con agua estéril tres veces por 3, 10 y 15 minutos respectivamente.