



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO



Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas

Facultad de Biología

Área temática:  
Conservación y Manejo de Recursos Naturales

**Metabolismo del carbono en la producción *in vitro* de  
bulbos de *Sprekelia formosissima* (L.) Herbert**

**TESIS**

Para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas

**PRESENTA**

**M.C. Agustín Uribe Treviño**

**DIRECTORA DE TESIS:**

Dra. Martha Elena Pedraza Santos

**COMITÉ TUTORAL**

Dra. Patricia Delgado Valerio  
Dr. Alejandro Martínez Palacios  
Dr. Juan Carlos González Hernández  
Dr. Pedro Antonio López

Morelia, Michoacán. Agosto 2024



DR. OMAR CHASSIN NORIA  
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
PRESENTE

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Metabolismo del carbono en la producción *in vitro* de bulbos de *Sprekelia formosissima* (L.) Herbert." presentado por el **M. C. Agustín Uribe Treviño (Núm. de Matrícula 9900832E)**, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Doctor en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

Atentamente

Morelia, Michoacán, a 5 de agosto 2024

COMITÉ SINODAL



Dra. Martha Elena Pedraza Santos (88001458)

Directora de tesis



Dr. Pedro Antonio López (10900471)

Presidente



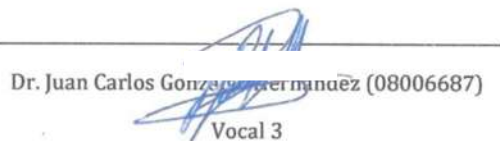
Dra. Patricia Delgado Valerio (07001851)

Vocal 1



Dr. Alejandro Martínez Palacios (99000032)

Vocal 2



Dr. Juan Carlos González Hernández (08006687)

Vocal 3

## **Agradecimientos**

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez".

Al Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas.

Al Concejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) y a la Coordinación de la Investigación Científica (CIC) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por el apoyo económico para realizar la presente investigación.

A la directora de este trabajo de investigación la Dra. Martha Elena Pedraza Santos.

A los miembros del comité evaluador, los Doctores Patricia Delgado Valerio, Alejandro Martínez Palacios, Juan Carlos Gonzáles Hernández y Pedro Antonio López.

Al Dr. Isaac Alejandro Salmerón Santiago por el apoyo brindado para la realización de las pruebas de laboratorio necesarias en este trabajo.

A mi esposa Katia y mis hijos Gael y Nicolás por su amor, paciencia y apoyo de siempre.

## CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DEL ÁPENDICE	vii
RESUMEN GENERAL	1
GENERAL ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	5
1.1 Hipótesis	8
1.2 Objetivo general	8
1.3 Objetivos específicos	8
II. REVISIÓN DE LITERATURA	10
Plantas bulbosas nativas con potencial ornamental	10
<i>Sprekelia formosissima</i>	11
Propagación <i>in vitro</i> de plantas bulbosas	12
Condiciones ambientales en la micropropagación de bulbos	14
Luz	14
Temperatura	17
Componentes del medio de cultivo en la micropropagación de bulbos	18
Sacarosa	18
Fósforo	20
Ácido abscísico	21
Dinámica del carbono en la formación de bulbos	23
Carbohidratos no estructurales	23
Almidón y las enzimas relacionadas con su síntesis	25
III. LITERATURA CITADA	27
IV. RESULTADOS	35
CAPÍTULO I. LA LUZ PROMUEVE LA BULBIFICACIÓN <i>in vitro</i> DE <i>Sprekelia formosissima</i> .	35
Resumen	35
Abstract	36
Introducción	37

Materiales y métodos	38
Resultados y discusión	42
Conclusiones	49
Literatura citada	49
CAPÍTULO II. SACAROSA Y FÓSFORO COMO ESTRATEGIA PARA MODIFICAR LA DINÁMICA DEL CARBONO EN BULBOS <i>in vitro</i> DE <i>Sprekelia formosissima</i> .	53
Resumen	53
Abstract	54
Introducción	55
Materiales y métodos	56
Resultados y discusión	60
Conclusiones	70
Literatura citada	71
CAPÍTULO III. TEMPERATURA BAJA Y ABA INDUCEN LATENCIA <i>in vitro</i> EN BULBOS DE <i>Sprekelia formosissima</i> .	74
Resumen	74
Abstract	75
Introducción	76
Materiales y métodos	77
Resultados y discusión	79
Conclusiones	88
Literatura citada	88
V. DISCUSIÓN GENERAL	90
VI. CONCLUSIONES GENERALES	95
VII. LITERATURA CITADA COMPLEMENTARIA	97
ÁPENDICE	99

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
1 Efecto de la intensidad de luz sobre el crecimiento de plántulas de <i>S. formosissima</i> propagados <i>in vitro</i> .	43
2 Efecto de la intensidad de luz sobre la concentración de clorofila y color de hojas de <i>S. formosissima</i> cultivada <i>in vitro</i> .	44
3 Tratamientos para evaluar el efecto de la sacarosa y fósforo sobre el metabolismo del carbono y crecimiento de bulbos de <i>S. formosissima</i> cultivados <i>in vitro</i> .	57
4 Cuadros medios del análisis de varianza para el efecto de sacarosa y fósforo sobre la concentración de carbohidratos no estructurales en bulbos de <i>S. formosissima</i> propagados <i>in vitro</i> .	60
5 Cuadros medios del análisis de varianza para el efecto de la concentración de sacarosa y fósforo sobre el crecimiento de <i>S. fomorsissima</i> propagada <i>in vitro</i> .	63
6 Efecto de la concentración de sacarosa y P en el medio de cultivo sobre peso fresco y diámetro de bulbo en <i>S. formosissima</i> propagada <i>in vitro</i> .	64
7 Cuadros medios del análisis de varianza para el efecto de la concentración de sacarosa y P sobre la actividad de las enzimas AGPasa, SSS y GBSS en bulbos de <i>S. formosissima</i> propagados <i>in vitro</i> .	65
8 Tratamientos para evaluar el efecto de la temperatura y ácido abscísico sobre el metabolismo del carbono y crecimiento de bulbos de <i>S. formosissima</i> cultivados <i>in vitro</i> .	78
9 Cuadros medios del análisis de varianza para el efecto de la temperatura y la concentración de ácido abscísico sobre el	80

	crecimiento de bulbos de <i>S. formosissima</i> cultivados <i>in vitro</i> .	
10	Efecto de la temperatura baja y la concentración de ácido abscísico sobre el número de hojas y raíces formadas en bulbos de <i>S. formosissima</i> cultivados <i>in vitro</i> .	81
11	Efecto de la concentración de ácido abscísico sobre el crecimiento de bulbo, hojas y raíces en <i>S. formosissima</i> cultivada <i>in vitro</i> .	83
12	Efecto de la temperatura y luz sobre el número de hojas y raíces en bulbos de <i>S. formosissima</i> cultivados <i>in vitro</i>	83
13	Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto de la temperatura y la concentración de ácido abscísico sobre el contenido de carbohidratos en bulbos de <i>S. formosissima</i> cultivados <i>in vitro</i> .	85
14	Efecto de la concentración de ácido abscísico sobre el contenido de carbohidratos no estructurales en bulbos de <i>S. formosissima</i> cultivados <i>in vitro</i> .	86
15	Efecto de la temperatura sobre el contenido de carbohidratos no estructurales en bulbos de <i>S. formosissima</i> cultivados <i>in vitro</i> .	87

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1 Número consecutivo asignado y nombre de colores de la Royal Horticultural Society registrados en hojas de <i>S. formosissima</i> propagada <i>in vitro</i> con diferente intensidad de luz.	40
2 Color de hojas en plántulas de <i>S. formosissima</i> a partir de bulbos propagados <i>in vitro</i> con diferente intensidad de luz.	44
3 Concentración de enzimas y tiempo de incubación para estimar almidón en bulbos de <i>S. formosissima</i> propagados <i>in vitro</i> .	47
4 Efecto de la intensidad de luz sobre el contenido de carbohidratos no estructurales en bulbos de <i>S. formosissima</i> propagados <i>in vitro</i> .	48
5 Concentración de carbohidratos no estructurales en bulbos de <i>S. formosissima</i> por efecto de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo.	61
6 Actividad enzimática y actividad enzimática específica de AGPasa, SSS y GBSS en bulbos de <i>S. formosissima</i> propagados <i>in vitro</i> bajo diferentes concentraciones de sacarosa y fósforo.	67
7 Efecto de la concentración de sacarosa sobre la actividad enzimática y actividad enzimática específica de AGPasa, SSS y GBSS en bulbos de <i>S. formosissima</i> propagados <i>in vitro</i> .	69
8 Efecto de la concentración de fósforo sobre la actividad enzimática y actividad enzimática específica de AGPasa en bulbos de <i>S. formosissima</i> propagados <i>in vitro</i> .	70

9	Bulbos de <i>S. formosissima</i> cultivados <i>in vitro</i> con diferentes concentraciones de ácido abscísico y condiciones de temperatura y luz.	82
10	Modelo propuesto para la dinámica del carbono en bulbos de <i>S. formosissima</i> y su crecimiento <i>in vitro</i> en respuesta a la exposición a cambios en la intensidad de luz, concentración de sacarosa, fósforo, ácido abscísico y temperatura.	94

## ÍNDICE DEL APÉNDICE

	Página
1A Cuadrados medios del análisis de varianza de la concentración de carbohidratos no estructurales por efecto de la intensidad de luz en plántulas de <i>S. formosissima</i> propagadas <i>in vitro</i> .	93
2A Cuadrados medios del análisis de varianza para la concentración enzimática y tiempo de incubación sobre la concentración de almidón en bulbos de <i>S. formosissima</i> propagados <i>in vitro</i> .	94
3A Cuadrados medios del análisis de varianza de la concentración de carbohidratos no estructurales por efecto de la intensidad de luz en plántulas de <i>S. formosissima</i> propagadas <i>in vitro</i> .	95
4A Cuadrados medios del análisis de varianza por rangos para el efecto de tratamientos con ABA y temperatura baja sobre el número de hojas en bulbos de <i>S. formosissima</i> cultivada <i>in vitro</i> .	100
5A Cuadrados medios del análisis de varianza por rangos para el efecto de tratamientos con ABA y temperatura baja sobre la longitud de raíz más larga en bulbos de <i>S. formosissima</i> cultivada <i>in vitro</i> .	100

## RESUMEN GENERAL

*Sprekelia formosissima* es una planta bulbosa con gran potencial ornamental que se cultiva en maceta. En condiciones naturales, la propagación vegetativa de *S. formosissima* es limitada, produce uno o ningún brote por año. A partir de semilla, la obtención de un bulbo maduro puede tardar hasta cuatro años. Las técnicas de cultivo *in vitro* son una alternativa para la propagación masiva plantas geófitas, porque los bulbos producidos generan plantas y flores vigorosas cuando alcanzan un mayor tamaño y acumulan carbohidratos no estructurales (CNE) (azúcares solubles totales, reductores, fructosa, sacarosa y almidón) que sirven como fuente de energía. Por lo anterior, en esta investigación se realizaron tres ensayos con el objetivo de estudiar el crecimiento, concentración de azúcares solubles totales (AST), reductores, fructosa, sacarosa y almidón y la actividad de las enzimas AGPasa, GBSS y SSS en bulbos de *S. formosissima* propagados *in vitro* bajo diferentes condiciones de incubación y componentes del medio de cultivo. En el primer ensayo se evaluó el efecto de la intensidad de luz (0, 30, 60, 120 y 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz) sobre el crecimiento y acumulación de CNE *in vitro* en bulbos de *S. formosissima*. Para determinar almidón se probaron 4 y 8 U de amiloglucosidasa y  $\alpha$ -amilasa con 6, 12 y 24 h de digestión. Los bulbillos se cultivaron en medio MS con 4 % de sacarosa y fotoperiodo de 16 h. A los 80 días se registraron los valores más altos para peso fresco (119.36 mg), seco (33.14 mg) y diámetro de bulbo (0.39 cm), número de hojas (2.25), clorofila a, b, total (0.71, 0.21 y 0.92 mg/g peso fresco, respectivamente) y almidón en bulbos (146.01 mg / g peso fresco) con 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz, los registros más bajos de estas variables se observaron en oscuridad. La concentración de almidón se realizó con 8 U de amiloglucosidasa y  $\alpha$ -amilasa y 24 h de digestión. Estos resultados demuestran que, contrario a lo que ocurre en otras especies geófitas, el incremento en la intensidad de luz promueve el crecimiento *in vitro* y la acumulación de almidón en bulbos de *S. formosissima*. En el segundo ensayo, se estudió el crecimiento, acumulación de CNE, la actividad enzimática (AE) y actividad enzimática específica (AEE) de AGPasa, SSS y GBSS en bulbos de *S. formosissima* bajo diferentes concentraciones de sacarosa (3, 5, 7, y 9 %) y P (0.62, 1.25 y 1.87 mmol). Los bulbillos se mantuvieron en medio MS con 2 mg L<sup>-1</sup> de BA en la oscuridad. A las doce semanas los AST, sacarosa, fructosa y almidón mostraron las mayores concentraciones en bulbos con 9 % de sacarosa en el medio de cultivo

(15.86, 8.49, 2.84 y 27.23 mg / g peso fresco, respectivamente). La AE y AEE de AGPasa aumentaron con 5 % de sacarosa y 1.25 mmol de P, la actividad de esta enzima se inhibió cuando la concentración de P en el medio de cultivo fue mayor. La AE y AEE de SSS y GBSS se incrementaron con 9 % de sacarosa y 0.62 y 1.25 mmol de P y con 7 % de sacarosa y 0.62 mmol de P, respectivamente. Estos datos confirman que, al subir la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, la acumulación CNE es mayor y muestran que las combinaciones de niveles de sacarosa altos y distintas concentraciones de P aumentan la actividad de AGPasa, SSS y GBSS en bulbos de *S. formosissima in vitro*. En el tercer experimento se registró el efecto de las condiciones de cultivo [10 °C en oscuridad (10-O) y 25 °C con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad (25-L)] y la concentración de ABA (0.0, 0.1, 0.5 y 1.0 mg L<sup>-1</sup>) sobre la latencia, crecimiento y CNE en bulbos de *S. formosissima*. Los explantes se mantuvieron por doce semanas en medio MS con 7 % de sacarosa. La formación de hojas y raíces disminuyó con 10-O sin ABA. El peso acumulado (0.268 g), diámetro de bulbo (7.36 mm), longitud de hojas más larga (7.65 cm), número (6.10), longitud promedio (2.91 cm), peso fresco de raíces (5.72 g) y almidón (150.24 mg / g peso fresco) aumentaron sin ABA, en cambio la mayor concentración de sacarosa y fructosa se observó con 1 mg L<sup>-1</sup> de ABA (10.03 y 2.60 mg / g peso fresco, respectivamente). A 10-O se observó un efecto similar sobre los CNE con una mayor concentración de AZT, sacarosa y fructosa (16.90, 8.00 y 1.86 mg / g peso fresco, respectivamente) y disminución del almidón (126.55 mg / g peso fresco). El ABA y temperatura baja inducen latencia en bulbos de *S. formosissima in vitro*, con incremento de azúcares solubles y disminución del almidón en estos órganos. Los resultados obtenidos pueden ser utilizados como base de la estrategia para la obtención *in vitro* de bulbos de *S. formosissima* en menor tiempo, con el tamaño y concentración de CNE que permitan un crecimiento vigoroso durante la aclimatación o brotación *ex vitro*.

Palabras clave: micropropagación de geófitas, carbohidratos no estructurales, intensidad de luz, latencia.

## GENERAL ABSTRACT

*Sprekelia formosissima* is a bulbous plant, which growth in a pot with great ornamental potential. Under natural conditions, vegetative propagation of *S. formosissima* is limited, producing one or no shoots per year. From seed, obtaining a mature bulb can take up to four years. *In vitro* propagation techniques are an alternative for the mass propagation of bulbs, which form vigorous plants and flowers when they reach a larger size and accumulate nonstructural carbohydrates (NSC) (total soluble sugars, reducing sugars, fructose, sucrose and starch) that serve as a source of energy. Three assays were carried out with the aim of studying the growth, concentration of total soluble sugars (AST), reducing sugars, fructose, sucrose, starch and the activity of the enzymes AGPase, GBSS and SSS in *S. formosissima* bulbs propagated *in vitro* under different incubation conditions and components of the culture medium. In the first trial, the effect of light intensity (0, 30, 60, 120 and 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of light) on the growth and accumulation of NSC *in vitro* in *S. formosissima* bulbs was evaluated. To determine starch, 4 and 8 U of amyloglucosidase and  $\alpha$ -amylase with 6, 12 and 24 h of digestion were tested. The bulblets were cultured in MS medium with 4 % sucrose and a photoperiod of 16 h. At 80 days the highest values were recorded for fresh weight (119.36 mg), dry weight (33.14 mg) and bulb diameter (0.39 cm), number of leaves (2.25), chlorophyll a, b, total (0.71, 0.21 and 0.92 mg / g fresh weight, respectively) and starch in bulbs (146.01 mg / g fresh weight) with 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of light, the lowest records of these variables were observed in darkness. Starch concentration was carried out with 8 U of amyloglucosidase and  $\alpha$ -amylase and 24 h of digestion. These results show that, contrary to what occurs in other geophyte species, the increase in light intensity promotes *in vitro* growth and starch accumulation in *S. formosissima* bulbs. In the second trial, growth, NSC accumulation, enzyme activity (EA) and specific enzyme activity (SEA) of AGPase, SSS and GBSS in *S. formosissima* bulbs were studied under different concentrations of sucrose (3, 5, 7, and 9 %) and P (0.62, 1.25 and 1.87 mmol). The bulblets were maintained in MS medium with 2 mg L<sup>-1</sup> of BA in dark. At twelve weeks, AST, sucrose, fructose and starch showed the highest concentrations in bulbs with 9 % sucrose in the culture medium (15.86, 8.49, 2.84 and 27.23 mg / g fresh weight, respectively). The AE and AEE of AGPase increased with 5% sucrose and 1.25 mmol of P, the activity of this enzyme was inhibited when

the concentration of P in the culture medium was higher. The AE and AEE of SSS and GBSS were increased with 9% sucrose and 0.62 and 1.25 mmol of P and with 7% sucrose and 0.62 mmol of P, respectively. These data confirm that, by increasing the sucrose concentration in the culture medium, NSC accumulation is greater and show that combinations of high sucrose levels and different concentrations of P increase the activity of AGPase, SSS and GBSS in *S. formosissima in vitro* bulbs. In the third experiment, the effect of culture conditions [10 °C in darkness (10-O) and 25 °C with a 16/8 h light/dark photoperiod (25-L)] and ABA concentration (0.0, 0.1, 0.5 and 1.0 mg L<sup>-1</sup>) on dormancy, growth and NSC in *S. formosissima* bulbs were recorded. The explants were maintained for twelve weeks in MS medium with 7% sucrose. Leaf and root formation decreased by 10-O without ABA. The accumulated weight (0.268 g), bulb diameter (7.36 mm), longest leaf length (7.65 cm), number (6.10), average length (2.91 cm), fresh weight of roots (5.72 g) and starch (150.24 mg / g fresh weight) increased without ABA, instead the highest concentration of sucrose and fructose was observed with 1 mg L<sup>-1</sup> of ABA (10.03 and 2.60 mg / g fresh weight, respectively). At 10-O a similar effect was observed on CNE with a higher concentration of AZT, sucrose and fructose (16.90, 8.00 and 1.86 mg / g fresh weight, respectively) and decreased starch (126.55 mg / g fresh weight). ABA and low temperature induce dormancy in *S. formosissima in vitro* bulbs, with an increase in soluble sugars and a decrease in starch in these organs. The results obtained can be used as a basis for the strategy to obtain *S. formosissima in vitro* bulbs in less time, with the size and concentration of CNE that allow vigorous growth during acclimatization or *ex vitro* sprouting.

Keywords: micropropagation of geophytes, nonstructural carbohydrates, light intensity, dormancy.

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

A principios del siglo XXI, la producción y comercialización de flores bulbosas era superior a un billón de dólares, con Holanda como el productor más importante con 75 % de la producción global (Benschop *et al.*, 2010). Los siete géneros de geófitas ornamentales que dominan el mercado florícola son *Tulipa*, *Lilium*, *Narcissus*, *Gladiolus*, *Hyacinthus*, *Crocus* e *Iris*; también son importantes *Freesia*, *Ornithogalum*, *Hippeastrum*, *Allium* y *Muscari*.

La saturación del mercado con estas flores y plantas, además de la demanda de los consumidores por nuevas variedades, ha estimulado el interés por evaluar la flora nativa como fuente de cultivos ornamentales. Israel, Australia, Sudáfrica, China, Japón y Corea son ejemplos de países en los que se han hecho investigaciones intensivas para el desarrollo de nuevas variedades de geófitas ornamentales a partir de material nativo (Kamenetsky, 2017).

México es un país megadiverso en el que se han descrito más de 25 mil especies de plantas vasculares, algunas con potencial para ser aprovechadas comercialmente como ornamentales (Cruz-Duque *et al.*, 2019). El uso de germoplasma nativo puede proporcionar a México ventajas competitivas a nivel internacional, ya que pueden obtenerse nuevas variedades con formas y colores atractivos y novedosos para la horticultura ornamental.

*Sprekelia formosissima* es una planta geófito, su flor es conocida comúnmente como lirio azteca y tiene amplia distribución desde el norte (Chihuahua) al sur de México (Oaxaca) y Guatemala (Tapia-Campos *et al.*, 2012; Cruz-Duque *et al.*, 2019). La propagación tradicional de *Sprekelia* es por división de bulbos, ya que la obtención de un bulbo maduro a partir de semilla puede llevar hasta cuatro años (Borys *et al.*, 2005).

En condiciones naturales, la propagación vegetativa de *Sprekelia* es limitada, produce uno o ningún brote por año. Por esto, las técnicas de propagación *in vitro* son una alternativa para la propagación masiva de plantas y una forma de prevenir la colecta excesiva de las poblaciones naturales (Cázarez *et al.*, 2010). Estas

técnicas también pueden acelerar el desarrollo de nuevas variedades (Tapia-Campos *et al.*, 2012) y permiten obtener propágulos vigorosos, homogéneos y libres de enfermedades (De Klerk, 2012).

El reto en la micropropagación de especies bulbosas es la formación de bulbos más que la formación de brotes nuevos. Los bulbillos producidos *in vitro* forman tallos y hojas sólo si crecen lo suficiente para lograr un estado de desarrollo adulto, los bulbos de menor tamaño pasan por un estado juvenil que en el caso de lilis forman únicamente hojas en roseta, lo que no es adecuado para el cultivo (De Klerk, 2012). La transición al estado adulto es más rápida en bulbillos de mayor tamaño y está asociada a concentraciones de sacarosa altas o concentraciones de sales bajas en el medio de cultivo. Además, la generación de bulbillos es favorecida por una relación alta de sacarosa/minerales del medio de cultivo, en la que el fósforo parece ser especialmente importante. El incremento del tamaño de bulbillos por efecto de concentraciones altas de sacarosa (60 – 90 g L<sup>-1</sup>) ha sido reportado en muchos cultivares de lilis (Langens-Gerrits *et al.*, 2003).

Los bulbos de *Sprekelia formosissima* cultivados *in vitro* incrementan su tamaño al aumentar la concentración de sacarosa de 30 a 50 g L<sup>-1</sup> (Cázarez *et al.*, 2010). Esto se relaciona con cambios en la concentración de carbohidratos no estructurales en los bulbos, principalmente almidón y azúcares solubles como la sacarosa; sin embargo, estos estudios se han limitado a reportar variables agronómicas como tamaño, peso fresco y dimensiones de los bulbos obtenidos sin considerar el estudio de las alteraciones del metabolismo del carbono generados por estas condiciones de cultivo.

La síntesis de almidón es un proceso complejo y altamente regulado que requiere la coordinación de múltiples enzimas que incluyen a la ADP-glucosa-pirofosforilasa (AGPasa), almidón sintasa (SS), enzima ramificadora de almidón (SBE) y la enzima desramificadora de almidón (DBE). La AGPasa es la primera enzima en la ruta para la síntesis de almidón, cataliza la reacción limitante de conversión de glucosa 1-fosfato y ATP a ADP-glucosa y pirofosfato inorgánico (PPi) en los amiloplastos. La actividad catalítica de esta enzima es estimulada por el ácido 3-fosfoglicérico e inhibida por el fosfato inorgánico (Pi). Las enzimas almidón

sintasas (SS) pueden dividirse en enzima sintasa ligada al gránulo de almidón (GBSS), la cual es responsable de la síntesis de amilosa y las fracciones de cadenas extralargas en la amilopectina y la almidón soluble sintasa (SSS), responsable de la síntesis de amilopectina (Qu *et al.*, 2018).

Por otro lado, el crecimiento y desarrollo de las plantas cultivadas *in vitro* son afectados significativamente por la intensidad de luz, calidad (color y longitud de onda) y fotoperiodo (Yang *et al.*, 2018). De acuerdo con algunos investigadores, la oscuridad promueve la formación de bulbos *in vitro* ya que simula las condiciones subterráneas de crecimiento naturales (Economou y Read, 1987; Witomska and Łukaszewska, 1997; Ulrich *et al.*, 1999; Rice *et al.*, 2011).

En *Narcissus tazetta* L. se estudió el efecto de la luz con dos tratamientos: oscuridad y 16/8 horas luz ( $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) / oscuridad. El mayor número de bulbos ( $13.5 \pm 1.44$ ), número ( $6.2 \pm 0.87$ ) y largo de hojas ( $0.86 \pm 0.46$ ) se obtuvo con el fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad. El número de bulbos fue casi el doble que los registrados en la oscuridad y la longitud promedio de la hoja fue de  $0.26 \pm 0.22$  cm. La oscuridad inhibió completamente la formación de bulbos en *Eucomis zambesiaca* y que por el contrario el fotoperiodo de 8 horas de luz promueve la mayor formación de bulbos (Cheesman *et al.*, 2010). Por el contrario, en *Hyacinthus orientalis* (Kim *et al.*, 1981) y *L. longiflorum* (Kumar *et al.*, 2006) se reportó un mayor número de brotes en condiciones de oscuridad. Los resultados de estos ensayos demuestran que las condiciones óptimas de la intensidad de luz y la oscuridad en la producción *in vitro* de órganos de reserva en las plantas geófitas son diferentes y deben ser estudiados en cada especie.

La inducción de la latencia está asociada a la formación de bulbos y su inicio y término es controlado por el nivel de inhibidores y promotores del crecimiento los cuales regulan el crecimiento y la diferenciación junto con la temperatura y la luz. En estudios hechos en *Iris*, *Hyacinthus*, *Lilium* y *Hyppeastrum* se ha demostrado que la latencia y formación de bulbos son procesos simultáneos. Además, se ha reportado que, durante la formación de bulbos, la concentración endógena de ABA se incrementa.

La temperatura ha sido utilizada para la alteración de los periodos de latencia y floración en diferentes plantas bulbosas, se han desarrollado protocolos exitosos para el almacenamiento de bulbos a bajas temperaturas y se ha demostrado que el rompimiento de la latencia por efecto de la temperatura parece ser específico para cada planta (Gul *et al.*, 2020a). En lilis la formación *in vitro* de bulbos se induce a 25 °C y ácido abscísico. En jacintos, la inducción de bulbos se logra con un tratamiento de bajas temperaturas por ocho semanas, seguido de la exposición a 25 °C y ácido abscísico (Podwyszynska, 2012). Con base en lo anterior se plantean las siguientes hipótesis y objetivos.

### **1.1 Hipótesis**

Durante la propagación *in vitro* de bulbos de *Sprekelia formosissima*, las condiciones de incubación y componentes del medio de cultivo inducen cambios diferenciales en el tamaño, la concentración de carbohidratos no estructurales y la actividad de las enzimas relacionadas con la síntesis de almidón en estos órganos.

### **1.2 Objetivo general**

Estudiar el crecimiento, concentración de azúcares solubles (totales, reductores, fructosa y sacarosa), concentración de almidón y la actividad de las enzimas AGPasa, GBSS y SSS en bulbos de *Sprekelia formosissima* propagados *in vitro* bajo diferentes condiciones de incubación y componentes del medio de cultivo.

### **1.3 Objetivos específicos**

1. Medir el crecimiento y la concentración de azúcares no estructurales en hojas y bulbos de *Sprekelia formosissima* propagada *in vitro* bajo diferentes condiciones de luz.
2. Evaluar el efecto de la concentración de sacarosa y fósforo en el medio de cultivo sobre la propagación y crecimiento de bulbos, concentración de almidón y la actividad de las enzimas relacionadas con su formación, así como la

concentración de azúcares solubles en bulbos de *Sprekelia formosissima* propagados *in vitro*.

3. Evaluar el efecto de la temperatura y ácido abscísico sobre la concentración de azúcares no estructurales y la inducción de latencia en bulbos de *Sprekelia formosissima* propagados *in vitro*.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

Las plantas ornamentales bulbosas son geófitas perennes que han desarrollado órganos subterráneos de reserva que les permiten sobrevivir durante las estaciones desfavorables en estado de reposo y reiniciar el crecimiento cuando las condiciones ambientales vuelven a ser adecuadas (Cortez, 2014). Un órgano de reserva es una parte de una planta modificada para almacenar agua y energía. La formación de estos órganos es una estrategia evolutiva para garantizar la supervivencia y propagación, regularmente son subterráneos y producto de la modificación de raíces, hojas, tallos o el hipocótilo (Li *et al.*, 2021).

Aunque los ciclos de vida y las estructuras morfológicas de los órganos de almacenamiento de las plantas geófitas son variables, el término flores bulbosas es empleado para referirse de forma genérica a plantas ornamentales con diferentes órganos de almacenamiento subterráneos (Kamenetsky y Okubo, 2013). Una flor bulbosa es aquella que se cultiva a partir de estos órganos de reserva como bulbos, cormos, raíces tuberosas o rizomas. Algunos ejemplos de flores bulbosas, según el órgano de reserva del cual se cultivan son: tulipán y lilis (bulbos:), gladiola (cormos), dalia (raíces tuberosas) y cala (rizomas) (Cortez, 2014). Casi todas estas especies pertenecen a 16 familias, la mayoría monocotiledóneas. Las plantas geófitas acumulan agua y nutrientes en los órganos de reserva, lo que les permite tener un rápido crecimiento de brotes y flores en condiciones de óptimas de cultivo (Podwyszynska, 2012), es por esto por lo que estas plantas se comercializan en su estado de reposo vegetativo, es decir, en forma de bulbo, tubérculo o rizoma (Cortez, 2014).

### **Plantas bulbosas nativas con potencial ornamental**

La generación de nuevas variedades es uno de los retos más importantes de la industria de las geófitas ornamentales, muchos países han realizado trabajos de investigación para evaluar su flora nativa como fuente de germoplasma para la horticultura ornamental. Actualmente numerosas especies de geófitas de Asia, África

o Sudamérica, podrían ser comercializadas, aunque solo el desarrollo de variedades podría generar beneficios económicos para estas regiones (Kamenetsky, 2017).

El sector florícola ha experimentado cambios a nivel global, entre ellos la demanda de nuevas variedades, lo cual requiere la generación de conocimiento para el mejoramiento, propagación y estrategias de comercialización. La producción de bulbos y otros órganos de reserva, el forzado y ciclos cortos de cultivo también son importantes (Bridgen, 2012).

Una gran variedad de especies de plantas geófitas han mostrado potencial para su producción comercial como ornamentales, aunque no se han desarrollado variedades por las características biológicas o ciclo de vida complicados para su manejo (Kamenetsky, 2017). Aunque se han hecho muchas investigaciones sobre especies nuevas y promisorias, la industria florícola mantiene a la tendencia de comercializar las geófitas más populares, mientras la producción comercial de geófitas ornamentales locales es modesta (Kamenetsky y Okubo, 2013).

### ***Sprekelia formosissima***

*S. formosissima* es una planta geófita herbácea perenne que pertenece a la familia Amaryllidaceae, se distribuye desde el norte (Chihuahua) al sur de México (Oaxaca) y Guatemala. Esta monocotiledónea presenta bulbos globosos tunicados con hojas basales en roseta, lineales de 20 a 45 cm de largo con un ápice obtuso que en ocasiones alcanzan los 75 cm. Presenta un tallo floral (raramente dos o tres) de 7 a 25 cm de longitud (algunas veces alcanza los 75 cm) que crece directamente desde el bulbo, regularmente con una sola flor que puede ser de diferentes tonos de rojo con simetría bilateral que puede alcanzar hasta 20 cm. La floración se concentra en marzo y abril, en cultivo puede florecer en cualquier época del año (Tapia-Campos *et al.*, 2012; Cruz-Duque *et al.*, 2019). Estas características hacen de esta especie una planta con potencial para ser utilizada en programas de mejoramiento genético para la obtención de nuevas variedades.

## Propagación *in vitro* de plantas bulbosas

Las tasas de propagación de la mayoría de las plantas geófitas ornamentales son bajas porque su multiplicación se basa en la división de los órganos de reserva y solo se obtienen unos pocos bulbos, cormos y tubérculos por año. Otro problema de este método de propagación vegetativa es que el material vegetal madre es utilizado por muchos años y existe el riesgo de propagar organismos fitopatógenos como bacterias y hongos a partir del material propagado (Chen y Ziv, 2005).

En el proceso de micropropagación de plantas geófitas ornamentales, la formación de bulbos, cormos o tubérculos es una etapa esencial, debido a que solo los órganos de reserva muestran un buen desarrollo en campo y capacidad alta para formar raíces, por ejemplo, los bulbos de lili y tulipán. Esto puede deberse a que los bulbos, cormos y tubérculos poseen una relación superficie-volumen más favorable y además tienen una capa de tejido externa más resistente a la desecación en comparación con el tejido de brotes.

El uso de órganos de reserva como “semilla” en las plantaciones, acorta el periodo para la producción de flores que en *Lilium* es de un año, en *Nerine* dos y de dos a tres años en *Tulipa* (Langens-Gerrits *et al.*, 2003; Ishimori *et al.*, 2007; Podwyszynska y Sochacki, 2010), estos órganos vegetativos son fáciles de manejar y transportar. En la propagación *in vitro* los bulbos jóvenes son utilizados para multiplicación y obtención de más bulbillos, a partir de escamas completas o fragmentos en *Lilium* (Skoric *et al.*, 2012), escamas gemelas en *Narcissus* y *Cyrtanthus* (Hong y Lee, 2012) o mitades o cuartos de bulbillos en *Amaryllis*, *Nerine* e *Hippeastrum* (Ilczuk *et al.*, 2005).

Recientemente se han hecho estudios sobre propagación *in vitro* de especies geófitas silvestres con potencial ornamental tales como *Dierama* sp. (Madubanya *et al.*, 2006; Koettle *et al.*, 2010), *Watsonia* sp. (Ascough *et al.*, 2008b), *Muscari azureum* (Uranbey, 2010), *Sprekelia formosissima* (Cázarez *et al.*, 2010), *Brunsvigia undulata* (Rice *et al.*, 2011), *Romulea minutiflora*, *Sisyrinchium laxum*, *Tritonia gladiolaris* (Ascough *et al.*, 2011) *Romulea sabulosa* (Swart *et al.*, 2012) y *Ornithogalum* sp. (Karaguzel *et al.*, 2012), en todos los casos, los investigadores

afirman que es indispensable contar con un método de propagación *in vitro* para el desarrollo de una nueva variedad ornamental a partir de germoplasma silvestre o para la conservación y restauración de poblaciones amenazadas (Podwyszynska, 2012), para esto es necesario considerar que la formación de bulbillos *in vitro* es afectada por varios factores que incluyen el genotipo de la planta, condiciones de cultivo y los suplementos adicionados el medio de cultivo (Ascough *et al.*, 2008a).

En condiciones naturales, la propagación vegetativa de *Sprekelia* es limitada porque una planta produce uno o ningún brote por año. Por esto, las técnicas de propagación *in vitro* son una alternativa para su propagación y una forma de prevenir la colecta excesiva de las poblaciones naturales.

Para la multiplicación *in vitro* de *Sprekelia formosissima* se ha estudiado el balance de citocininas y auxinas BA/IBA (2.05/0.25, 5/0.5, 10/1.0, 15/1.5 y 20/2.0  $\mu\text{M}$ ), el mayor porcentaje de bulbos que desarrollaron brotes (75 %), el número de brotes por bulbo (2.66) y diámetro de bulbo (2.0) se registró con la relación 20/2.0  $\mu\text{M}$  de BA/IBA. También se estudió el efecto de concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo de 1, 2, 3, 4 y 5 %, el diámetro del bulbo varió de 2.9 a 4.2 mm y el número de hojas se incrementó de 2.0 a 3.5 con 5 % de sacarosa, que fue la mejor concentración para el crecimiento de los bulbos.

Los bulbos de *Sprekelia formosissima* que se cultivaron durante dos semanas en medio MS con 0, 0.49, 0.98, 1.96, 3.93 y 7.8  $\mu\text{M}$  de ácido indol 3-butírico (IBA) registraron el mayor porcentaje de bulbos con raíces (93.75 %) con 0.98  $\mu\text{M}$  de IBA. El número de raíces por bulbo se incrementó de forma gradual con el aumento de la concentración de IBA de 0 a 1.96  $\mu\text{M}$  (1.06 a 2 raíces por bulbo) mientras que concentraciones más elevadas de IBA disminuyeron el número de raíces por bulbo (1.37 y 1.05 con 3.93 y 7.8  $\mu\text{M}$  de IBA, respectivamente). La longitud de la raíz disminuyó de 3.67 a 0.36 con el incremento de la concentración de IBA de 0 a 7.8  $\mu\text{M}$ . Después de 7 semanas en sustrato elaborado con suelo orgánico y agrolita (2:1 v/v) se encontró un 83 % de supervivencia en plantas de *S. formosissima* obtenidas *in vitro*. Este protocolo de micropropagación permitió obtener al menos 96 bulbos por cada bulbo madre en 6 meses (Cázarez *et al.*, 2010).

## Condiciones ambientales en la producción *in vitro* de bulbos

### Luz

La luz es uno de los factores ambientales más importantes en el cultivo de tejidos (Ascough *et al.*, 2008b). Los fotoreceptores de las plantas han evolucionado en estructuras bioquímicas articuladas que capturan fotones y detectan muchas de las propiedades físicas de la luz que son traducidas en respuestas bioquímicas y biológicas capaces de regular el desarrollo de las plantas (Cavallaro, *et al.*, 2022). Aunque las plantas cultivadas *in vitro* son generalmente heterotróficas o mixotróficas con una capacidad fotosintética limitada (la fuente de carbono es la sacarosa suministrada a través del medio de cultivo), la luz tiene una función clave en la expresión de genes, el metabolismo primario y secundario y el crecimiento y desarrollo de los explantes (fotomorfogénesis) (Lin *et al.*, 2011). En este contexto es claro que la luz tiene un rol importante para la producción exitosa de plantas *in vitro* junto a otros factores como la composición del medio, la temperatura y las características fisiológicas del explante (Seabrook, 2005). El control de la calidad de luz (rangos de longitud de onda), intensidad de luz o irradiación (flujo de fotones) y régimen de luz (fotoperiodo) hace posible la producción *in vitro* de plantas con las características deseadas (Miler *et al.*, 2018).

En la morfogénesis de geófitas ornamentales se ha reportado que hay tres tipos de respuesta al fotoperiodo con relación a la inducción de la formación de los órganos de reserva: inducción inhibida por la oscuridad, inducción promovida por la oscuridad e inducción promovida por la luz y la oscuridad (Ascough *et al.*, 2008b). La calidad e intensidad de la luz también pueden influir en el desarrollo y crecimiento de estas plantas (Bach y Sochacki, 2013).

En tulipán y lili el número de bulbos generados fue mayor cuando los explantes fueron irradiados con luz roja o amarilla o cultivados en la oscuridad (Rice *et al.*, 1983; Pelkonen y Kauppi, 1999). Además, el tipo de luz puede interactuar con el balance de diferentes carbohidratos (Bach y Sochacki, 2013). En general, el uso de glucosa como fuente de carbono y el cultivo con luz azul o blanca promueve la producción de brotes adventicios de jacintos cultivados *in vitro*. En contraste, la

producción de bulbos maduros y bien desarrollados se ha observado con sacarosa y condiciones de oscuridad o luz roja. Esto indica que la luz del rojo lejano y roja induce la latencia del bulbo, mientras que con la luz azul se generan brotes nuevos y se inhibe la maduración de bulbos adventicios (Bach y Swiderski 2000). Este efecto puede estar relacionado con la capacidad de la luz azul para disminuir la concentración de ácido abscísico (Bach y Sochacki, 2013) que es requerido para la latencia y formación de bulbos (Langens-Gerrits *et al.*, 2003).

La formación de órganos de reserva en plantas geófitas es un proceso que se ha estudiado con profundidad en papa, en esta planta, la formación de microtubérculos *in vitro* se ha incrementado con la modificación de factores de incubación como la temperatura y la luz (Lavrynenko *et al.*, 2016). En plántulas de papa *in vitro* la formación de microtubérculos (tuberización) se puede inducir con reguladores de crecimiento o mediante la modificación de factores ambientales (periodos de luz cortos o temperatura) incluso con ausencia de sacarosa y sin reguladores de crecimiento. Para la formación de microtubérculos se recomienda la incubación de los explantes en la oscuridad o con intensidades de luz bajas (50 – 100 lux) con un periodo de luz de 8 a 12 horas (Seabrook, 2005). El almacenamiento *in vitro* de tubérculos de papa en la oscuridad disminuye el tamaño de estos órganos de reserva lo que puede revertirse con un fotoperiodo de 16 horas de luz con 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con el que se incrementa la acumulación de biomasa y mejora la brotación (Naik y Sarkar, 1997). La intensidad de luz también afecta la duración de la dormancia de los microtubérculos de papa. Los microtubérculos inducidos y desarrollados en un fotoperiodo de 8 h de luz comparados con la oscuridad mostraron una dormancia más corta, mientras que estos órganos tienen un periodo de latencia más largo cuando son almacenados con luz difusa en comparación con la oscuridad (Seabrook, 2005).

En el cultivo de lili, uno de los más importantes entre las plantas ornamentales a nivel mundial, las tasas de multiplicación de bulbos que se obtienen *in vitro* son altas, aunque los bulbos presentan un tamaño pequeño que no es apropiado para ser usados de forma comercial. En un experimento para la propagación de esta especie *in vitro* se probaron tres condiciones de luz (continua, fotoperiodo de 16 h y oscuridad) y tres concentraciones de sacarosa (3, 6 y 9 %). El peso fresco y

diámetro de bulbillos se incrementó con 9 % de sacarosa en el medio de cultivo y con oscuridad constante (226 y 200 mg y 5.8 y 6.8 mm, respectivamente). La formación de hojas y raíces se inhibió por completo en la oscuridad (Kumar *et al.*, 2005). El incremento en el tamaño del bulbo con concentraciones altas de sacarosa se debe principalmente a la acumulación de almidón y carbohidratos totales (Langens-Gerrits *et al.*, 2003). Los explantes cultivados con luz produjeron un mayor número de bulbillos, aunque de menor tamaño en comparación con los explantes cultivados en la oscuridad donde se obtuvo un sólo bulbo, lo que puede deberse a que la producción de más de un bulbo generó competencia por nutrientes mientras que los bulbos solos tuvieron mayor disponibilidad de nutrientes para crecer. Esto demuestra que las concentraciones altas de sacarosa y la incubación en la oscuridad pueden ser utilizadas para incrementar el tamaño de los bulbos de lili obtenidos *in vitro*, lo que es indispensable para obtener una planta con crecimiento vigoroso que produzca flores de calidad (Kumar *et al.*, 2005).

En *Narcisuss papyraceus* se probaron los tratamientos combinados con los factores sacarosa (3, 6 y 9 %) e intensidad de luz (oscuridad, 54 y 108  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). A los 90 d se registró un mayor número de bulbillos por explante (4.45) con 6 % de sacarosa y 54  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mientras que el número de bulbillos decreció en la oscuridad y/o con la más alta intensidad de luz independiente de la concentración de sacarosa. La longitud (19.68 mm) y diámetro (11.43 mm) del bulbo se incrementaron con la más alta concentración de sacarosa e intensidad de luz (9 % y 108  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente), los bulbos más pequeños se obtuvieron en la oscuridad con 3 % de sacarosa con 7.12 mm de largo y 4.5 mm de diámetro. Con el incremento de la intensidad de luz, los bulbillos comienzan a almacenar nutrientes y como consecuencia incrementan su tamaño. También se observó que el incremento de la intensidad de luz (108  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) coincide con una disminución en el número de bulbillos formados, lo que sugiere un efecto antagonista entre la concentración de sacarosa y la intensidad de luz, lo que resulta en la acumulación de sacarosa en los bulbos y una disminución en el número de bulbos que se producen (Hosseini *et al.*, 2013). Los resultados reportados en *Lily* y *Narcisuss* demuestran que en cada especie bulbosa deben estudiarse y evaluarse las condiciones de luz óptimas para la propagación de bulbos de un tamaño adecuado que provean de los carbohidratos necesarios para la posterior brotación de la planta.

## Temperatura

La temperatura es un regulador natural de la morfogénesis, no solo regula las tasas de crecimiento sino también la transición entre estados vegetativos y reproductivos durante el desarrollo de las plantas (Ascough *et al.*, 2008a). El efecto de la temperatura sobre la inducción de los órganos de reserva en plantas bulbosas varía con la especie. En *Eucomis zambesiaca* se probaron diferentes temperaturas de incubación (10, 15, 20, 25 y 30 °C) sobre secciones de hojas utilizadas como explante para la formación de bulbos, el mayor número de bulbos por explante (3) y peso de bulbos (60.19 mg) se registró con 20 °C; a 25 °C el número de bulbos fue menor (1.65) (Cheesman *et al.*, 2010). En *Albuca pachychlams* se observó una mayor supervivencia *ex vitro* de plántulas a 10 y 15 °C, sin embargo, la acumulación de biomasa en las plántulas y bulbos fue mayor a 25 °C (Kulkarni *et al.*, 2005). Esta respuesta puede ser aprovechada en ambas especies para inducir la formación de bulbillos a temperaturas más bajas con respecto a la temperatura utilizada para promover su crecimiento (Cheesman *et al.*, 2010) y además muestran que el control de la temperatura puede ser utilizado para inducir la formación y crecimiento de los órganos de reserva en las plantas bulbosas.

Por otro lado, el tratamiento con temperaturas bajas es el único mecanismo industrializado utilizado para el manejo de la latencia en las plantas bulbosas (Sun *et al.*, 2007). La latencia y el rompimiento de latencia son fenómenos complejos e importantes en estas plantas (Dole, 2003) y su regulación es un reto que debe resolverse para la aplicación de prácticas tecnológicas que permitan (Gude *et al.*, 2000) determinar en qué momento los bulbos están maduros o en una etapa de rompimiento de latencia, controlar la latencia y la brotación durante el cultivo y qué condiciones son necesarias para el crecimiento normal del bulbo (Sun *et al.*, 2007). El tratamiento con temperaturas bajas generalmente es necesario para inducir la brotación en lilis después de cosechar los bulbos (Langens-Gerrits *et al.*, 2003), aunque los efectos provocados por este tratamiento son muy diversos y dependen de la especie o variedad, condiciones de cultivo e incluso del tamaño de los bulbos de la misma variedad. Usualmente el rompimiento de la latencia en *Lily* se logra con temperaturas de 0 a 8 °C por 60 a 120 días (Gude y Verbruggen, 2000).

Durante el tratamiento con temperatura baja hay fases en las que el almidón disminuye y se acumulan azúcares solubles que es acompañada por la síntesis de enzimas relacionadas con estos carbohidratos. En *Lilium rubellum*, el almacenamiento de los bulbos por 14 semanas a 4-8 °C promovió el incremento de las concentraciones de sacarosa, glucosa y fructosa en 1.5, 1.8 y 1.9 veces (Xu *et al.*, 2006). La sacarosa es un azúcar soluble esencial que sirve como un transportador de carbohidratos en los bulbos de lilis, su concentración incrementa continuamente durante las 10 semanas de almacenamiento de estos órganos y luego decrece, en cambio la concentración de glucosa y fructosa aumenta hasta 14 semanas después del inicio de la exposición a temperaturas bajas. Estos cambios en las formas disponibles de los carbohidratos están asociados con el nivel de brotación del bulbo y dependen de la temperatura y tiempo de almacenamiento que afectan el metabolismo de los carbohidratos y la brotación del bulbo (Sun *et al.*, 2007).

Los niveles endógenos de hormonas en los bulbos están relacionados con la latencia y su rompimiento. El ABA es clave en la inhibición del desarrollo de la yema de los bulbos en la que disminuye por efecto de temperaturas baja mientras se incrementa el contenido de GA<sub>3</sub> y la relación GA<sub>3</sub>/ ABA que son claves en la brotación del bulbo. Al mismo tiempo, el tratamiento con temperatura baja incrementa la actividad de la enzima amilasa lo que resulta en una degradación rápida del almidón que provee de azúcares solubles suficientes para inducir el crecimiento de la yema (Sun *et al.*, 2007).

## **Componentes del medio de cultivo para la producción *in vitro* de bulbos**

### **Sacarosa**

En la micropropagación de especies bulbosas se busca producir bulbillos grandes (Kumar *et al.*, 2005) ya que el vigor y el crecimiento de las plantas están directamente relacionados con el tamaño de los órganos subterráneos que las producen. Estos órganos deben alcanzar un tamaño adecuado para que la planta

produzca flores y su crecimiento *in vitro* es afectado por la sacarosa (Lian *et al.*, 2003).

La sacarosa es considerada como la mejor fuente de carbono para el cultivo de tejidos *in vitro* (George y Sherrington, 1984), es hidrolizada parcial o totalmente a glucosa o fructosa que son absorbidas por los tejidos vegetales del medio de cultivo (Cheesman *et al.*, 2010). Durante el crecimiento y desarrollo de las plantas, la sacarosa puede ser utilizada como fuente de carbono y energía, regulador osmótico y además puede influir en las funciones fisiológicas de las plantas mediante la activación de vías de señalización específicas (Gao *et al.*, 2018). En las células no fotosintéticas de las plantas superiores, la sacarosa es transportada desde los tejidos fotosintéticos en donde se degrada a los monosacáridos que la constituyen, hexosas o hexosas fosforiladas que pueden ser utilizadas en reacciones metabólicas (Ruan, 2014).

La sacarosa y otros azúcares solubles tiene un efecto diferente sobre la formación y expansión de los bulbos. La capacidad de modular la inducción y el llenado de los bulbillos es más fuerte en la sacarosa y decrece en este orden: glucosa + fructosa, glucosa y fructosa. La sacarosa promovió la formación del doble de bulbillos en *Lilium sargentiae* E.H. Wilson en comparación con glucosa y fructosa, lo que indica que la sacarosa tiene una mayor eficiencia en la inducción de la formación de bulbos en comparación con otros azúcares solubles y que esta eficiencia no está determinada sólo por su función como fuente de carbono y energía sino por su función como señalador molecular (Gao *et al.*, 2018).

Rodríguez-Falcón *et al.* (2006) reportaron que en papa la sacarosa actúa como factor en la expresión de genes, que están involucrados en la formación y crecimiento de los órganos de reserva *in vivo* o *in vitro*. La sacarosa también sirve como fuente de carbono para la biosíntesis de carbohidratos e induce cambios en la osmolaridad del medio de cultivo (Podwyszynska, 2012) que afectan la morfogénesis de las plantas cultivadas *in vitro*. Los genes de ADP-glucosa pirofosforilasa (enzima clave en la regulación de la síntesis de almidón y sacarosa) son activados por la sacarosa (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999).

La concentración de sacarosa alta de 6 a 10 % en el medio de cultivo *in vitro* induce la formación de órganos de almacenamiento en varias especies de geófitas ornamentales de los géneros *Lilium*, *Tulipa*, *Narcissus*, *Hyacinthus*, *Gladiolus*, *Eucrosia*, *Chalochortus*, *Crinum*, *Cyclamen*, *Crocus*, *Dierama*, *Iris*, *Hippeastrum*, *Cyrtanthus* y *Rumuela* (Podwyszynska, 2012). En lilis, el porcentaje de crecimiento del bulbo atribuido a la sacarosa del medio de cultivo es de 45 – 50 % en explantes de 15 mm de largo y 65 – 75 % para explantes de 5 mm de largo (Askari *et al.*, 2018), esto muestra la importancia del tamaño del explante, así como la fuente de sacarosa para el crecimiento de los bulbillos.

Es importante determinar la concentración óptima de sacarosa para el crecimiento de los bulbos *in vitro* ya que en *Lilium sargentiae* E.H. Wilson con 6 % de sacarosa se registraron los valores más altos para el diámetro (17.7 mm), peso fresco (2.1 g) e índice de crecimiento (762.1 %) en los bulbillos. Sin embargo, cuando se incrementó la concentración de sacarosa a 9 % el efecto del crecimiento del bulbo decreció a niveles comparados a los observados con 3 % del carbohidrato con valores de 12.3 mm, 1 g y 717.3 %, respectivamente (Gao *et al.*, 2018).

## **Fósforo**

La composición mineral de los medios de cultivo tiene efecto sobre la morfogénesis de las plantas cultivadas *in vitro* (Ramage y Williams, 2002). El medio MS ha sido ampliamente utilizado para la micropropagación de especies geófitas como la papa (Lekamge *et al.*, 2021), aunque su composición mineral es insuficiente para la concentración de P requerida por algunas especies como *Curcuma longa* L. y algunos genotipos de *Hemerocallis* (Adelberg *et al.*, 2013). El P tiene un efecto importante en el incremento del crecimiento de la papa cultivada *in vitro* (Lekamge *et al.*, 2021) y es esencial como componente estructural de ácidos nucleicos, fosfolípidos y ATP (Adelberg *et al.*, 2010) y en numerosas funciones incluidas el metabolismo de carbohidratos (Vance *et al.*, 2003).

El P está presente en los tejidos vegetales en dos formas: ortofosfato inorgánico (Pi) y ésteres de fosfato orgánicos. La forma de Pi metabólicamente activo se localiza en el citoplasma, mientras que el exceso de P es almacenado en la

vacuola desde donde se suministra al citoplasma en función de la demanda. Los compuestos esterificados del P existen en varias formas, ácidos nucleicos, fosfolípidos, proteínas y metabolitos fosforilados como los azúcares fosfato que se forman por la fosforilación de monosacáridos después de su reacción con ATP. Estos compuestos son los primeros intermediarios en la síntesis y degradación de almidón y otros procesos metabólicos como la fotosíntesis, respiración y glicolisis e incluyen al ácido fítico, glucosa-6-fosfato y dihidroxiacetona fosfato (Malhotra *et al.*, 2018).

Los niveles de Pi regulan la distribución del C entre la síntesis de sacarosa y almidón y la distribución de fotosintatos en los tejidos de la planta (Malhotra *et al.*, 2018). El suministro limitado de Pi en los cloroplastos desplaza el flujo de C hacia el almidón. Esto se logra mediante la estimulación de una enzima clave en la biosíntesis del almidón, la ADP-glucosa pirofosforilasa, en niveles bajos de Pi y altos de triosa-P. Asimismo, una mayor concentración de Pi en el estroma induce la descomposición del almidón (Nielsen *et al.*, 1998).

### **Ácido abscísico**

En muchas especies bulbosas el ABA ha sido asociado a la latencia (fenómeno regulado por la temperatura, luz y hormonas en el que cesa del crecimiento y el metabolismo se detiene parcialmente). La disminución del nivel de ABA se ha correlacionado con el rompimiento de la latencia en *Lilium rubellum*, un patrón similar de disminución de ABA se registró durante el almacenamiento de cebolla. Los bulbos de *Iris* mostraron niveles altos de ABA previo al rompimiento de la latencia. En *Polianthes tuberosa* el ABA induce y mantiene la latencia (Gul *et al.*, 2020).

La formación del bulbo y la inducción de la latencia de estos órganos son fenómenos relacionados y regulados por el ácido abscísico, como lo sugieren los resultados de experimentos realizados en jacinto (*Hyacinthus orientalis* L. 'Delft Blue') en donde 70 % de los explantes incubados por cuatro semanas a 25 °C seguido de ocho semanas a 5 °C formaron bulbos, mientras que en los explantes sin tratamiento con frío se observó menos de 20 % de brotes con bulbos. El ácido

abscísico promovió la formación de bulbos en explantes incubados sin frío, a las 22 semanas se alcanzó 35, 58, 75 y 50 % de brotes con bulbos con 0, 0.1, 1.0 y 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido abscísico, respectivamente. La fluridona es un inhibidor de la síntesis de ácido abscísico. La exposición de los explantes incubados a 5 °C a fluridona disminuyó la formación de bulbos a las veintidós semanas de 100 % en el tratamiento control a 45, 20 y 0 % con 0.03, 0.3 y 3 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (Li *et al.*, 2002).

Durante la formación de cormos de *Gladiolus hybridus* la concentración de ácido abscísico se incrementa y disminuye la concentración de giberelinas. Al silenciar el gen GhNCED que expresa la síntesis de la enzima 9-cis-epoxycarotenoide-dioxigenasa, clave en la producción de ácido abscísico, se reporta una reducción en el contenido de esta fitohormona con un incremento de giberelinas y una brotación de cormos anticipada. Estos cormos formaron plantas con una concentración de almidón menor en sus hojas que produjeron cormos pequeños y delgados. En cambio, en los cormos en los que se silenció el gen (GhGA20ox) para la biosíntesis de ácido giberelico (AG<sub>3</sub>), se registró una disminución en los niveles de AG<sub>3</sub> y un efecto contrario con la formación de cormos más grandes y de mayor peso. Los cormos con el gen GhNCED silenciado también mostraron una disminución considerable en la concentración de sacarosa y almidón, en comparación con los cormos utilizados como control, mientras los cormos con el gen GhGA20ox silenciado, mostraron concentraciones mucho mayores. Esto demuestra que el ácido abscísico tiene un efecto positivo sobre la formación de cormos mientras que las giberelinas afectan su formación y que ambas hormonas están correlacionadas con el contenido de almidón. Este rol antagonista entre el ABA y el AG se debe a que tienen una función diferencial de regulación del gen GhSUS<sub>2</sub>, el cual es expresado principalmente en los órganos demanda y es responsable de la formación de sacarosa sintasa que cataliza la conversión reversible de sacarosa a fructosa y UDP-glucosa a partir de los cuales se forma 1-P glucosa, sustrato de la primera enzima en la síntesis del almidón AGPasa (Li *et al.*, 2021).

## **Dinámica del carbono en la formación de bulbos**

El proceso de tuberización (proceso mediante el cual se forman los órganos de reserva en las plantas geófitas) es controlado por la interacción de factores ambientales, bioquímicos y genéticos. En general, este proceso comprende tres etapas: 1) inducción, 2) iniciación y 3) crecimiento del órgano de almacenamiento (Sarkar, 2008). La inducción se desencadena por señales exógenas como temperaturas altas o bajas, días largos o cortos y concentraciones de sacarosa altas. Durante la iniciación se incrementa la biosíntesis de carbohidratos y la etapa de crecimiento de bulbo, cormo, tubérculo o cualquier órgano de almacenamiento se relaciona con la acumulación de agua y reserva de nutrientes, principalmente carbohidratos, además del inicio de un periodo de latencia (Podwyszynska, 2012).

La formación y desarrollo de los bulbillos están estrechamente relacionados con el metabolismo de los carbohidratos (Li *et al.*, 2014) y a pesar de la importancia de los carbohidratos de reserva en las geófitas ornamentales y sus implicaciones económicas a nivel mundial, hay una escasez de información relacionada a su identidad y distribución entre las especies. En cultivo *in vitro* es de interés investigar las funciones específicas de estos carbohidratos y cómo éstos son utilizados durante el crecimiento y desarrollo de estas especies (Ranwala y Miller, 2008).

### **Carbohidratos no estructurales**

Las plantas asimilan el carbono vía fotosíntesis y utilizan la mayor parte en el metabolismo (por ejemplo, la respiración) y la síntesis de compuestos estructurales, una fracción pequeña es retenida en forma de compuestos de carbono no estructurales que incluyen a los carbohidratos no estructurales (almidón, azúcares solubles y fructanos en algunas hierbas y pastos) y lípidos neutros que abundan en algunos taxones. Estos carbohidratos son conocidos como de almacenamiento, debido a que se utilizan para mantener la actividad metabólica nocturna y para una variedad de funciones durante condiciones de estrés en las que la asimilación de carbono es insuficiente para cubrir la demanda (Martínez *et al.*, 2016). A pesar de la importancia de los carbohidratos no estructurales sobre el balance del carbono en

las plantas, el conocimiento sobre su dinámica, función y regulación aún es limitado (Dietze *et al.*, 2014).

Las plantas geófitas han evolucionado para sobrevivir en ambientes adversos a través de la producción de órganos subterráneos de reserva que sirven también para la propagación vegetativa. El almacenamiento de grandes cantidades de carbohidratos no estructurales en los órganos de almacenamiento en las geófitas asegura una fuente de carbono y suministro de energía durante condiciones no favorables, además permite una brotación y crecimiento reproductivo rápidos en condiciones ambientales favorables (Ranwala y Miller, 2008).

La sacarosa se produce en los órganos fuente (por ejemplo, las hojas) y es transportada a los órganos demanda (órganos no fotosintéticos) donde se utiliza para la producción de almidón que se almacena en los amiloplastos. La sacarosa es transportada entre las células de los órganos demanda a través de los plasmodesmos y transportadores (Ma *et al.*, 2019; Stein y Granot, 2019). La sacarosa es hidrolizada por la invertasa a fructosa y glucosa en el citosol o dividida en fructosa y uridina glucosa difosfato por la sacarosa sintasa. La uridina glucosa difosfato puede ser transformada después en adenosina difosfato glucosa (ADP glucosa) por la UGPasa y AGPasa y es el sustrato principal para la biosíntesis de almidón en angiospermas, catalizado por las almidón sintasas que adicionan el residuo glucosídico a las cadenas de glucanos (Li *et al.*, 2021).

La concentración de carbohidratos no estructurales (almidón y/o fructanos y azúcares solubles) se utiliza frecuentemente para estudiar y medir el almacenamiento. La composición exacta de los azúcares solubles en las plantas terrestres es variable, aunque glucosa, fructosa y sacarosa son los compuestos más comúnmente medidos (Martínez *et al.*, 2016). Estos carbohidratos fueron registrados en 30 ornamentales geófitas en concentraciones menores a 100 mg g MS<sup>-1</sup>, el almidón y fructanos fueron los carbohidratos no estructurales más abundantes (> 90 %), entre los cuales el almidón predominó. El almidón es la principal forma de reserva de carbohidratos y energía en las plantas, en los órganos de almacenamiento de las geófitas se conserva en los amiloplastos desde donde se utiliza para reiniciar el crecimiento (Ranwala y Miller, 2008).

## **Almidón y las enzimas relacionadas con su síntesis**

El almidón sirve como la principal forma de almacenamiento en las plantas superiores y se acumula en los órganos demanda (por ejemplo, semillas, raíces y bulbos) antes de concluir cada ciclo de vida. El análisis del transcriptoma en papa y *Lilium* sugiere que el metabolismo de la sacarosa y el almidón está relacionado con la tuberización y la transición de brote a bulbo (Wu *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2014; Gul *et al.*, 2020b).

La síntesis de carbohidratos de reserva, incluido el almidón, está altamente relacionada con los últimos estados de formación de los órganos de almacenamiento en las plantas geófitas (Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006). El almidón consiste en dos tipos de polisacáridos: amilosa y amilopectina. La amilosa es un polímero lineal formado por cadenas de glucosa unidas con enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4, tiene pocas ramificaciones a través de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,6. La molécula de amilopectina es más grande que la molécula de amilosa y contiene ramificaciones abundantes mediante enlaces  $\alpha$ -1,6 que conectan cadenas de glucanos unidas a través de enlaces  $\alpha$ -1,4 que forman una estructura repetida de laminillas amorfas y cristalinas (Jeon *et al.*, 2010).

El almidón es la principal forma de reserva de carbohidratos y energía en las plantas, puede dividirse en dos formas, transitorio y de almacenamiento. En los tejidos fotosintéticos los almidones transitorios se acumulan en los cloroplastos durante el día y por la noche son transportados y degradados para proveer energía para el crecimiento y metabolismo. En los tejidos no fotosintéticos como semilla, endospermo, tubérculos y raíces de almacenamiento, el almidón de almacenamiento es conservado por periodos largos en plastidios especializados llamados amiloplastos desde donde puede ser movilizado para la germinación, brotación o para reiniciar el crecimiento (Pfister y Zeeman, 2016).

El almidón sintetizado en los amiloplastos de los órganos de reserva es depositado como un cristal granulado que consiste en amilosa (20 – 30 %) y amilopectina (70 – 80 %) (Ji *et al.*, 2003). En la biosíntesis de este homopolisacárido la ADP-glucosa-pirofosforilasa (AGPasa) cataliza el primer paso al utilizar la glucosa-

1-fosfato y ATP para formar ADP-glucosa (el sustrato para la síntesis de almidón) y pirofosfato (PPi). La enzima AGPasa ha sido estudiada en muchos órganos demanda en plantas, en frijol mungo (*Vigna radiata*) se postula que la actividad de demanda de la semilla es muy alta y se mantiene una actividad ininterrumpida de las enzimas que controlan el flujo de C a este órgano para alcanzar un tamaño adecuado (Chopra *et al.*, 2007). La enzima sintasa ligada al gránulo de almidón (GBSS) puede elongar la amilosa (Nelson y Rines, 1962) mientras que la enzima almidón soluble sintasa (SSS) está involucrada en la biosíntesis de amilopectina (Streb y Zeeman, 2012).

La AGPasa y los transcritores de las enzimas SSS, GBSS y la enzima ramificadora de almidón son altamente regulados durante el desarrollo de los tubérculos en papa (Viola *et al.*, 2001). La regeneración *in vitro* de bulbos en *Narcissus tazetta* está altamente correlacionada con la actividad de la AGPasa y la concentración de almidón en los explantes iniciales (Chen y Ziv, 2005). En bulbos de jacinto recién formados *in vivo*, se registró una actividad alta de AGPasa y las almidón sintasas, además de la acumulación de almidón en estos órganos (Addai, 2011). El incremento en la actividad de la AGPasa y la correlación con la acumulación de almidón, parecen ser un marcador bioquímico de la etapa inicial en la formación de bulbos en narciso y jacinto y de tubérculos en papa (Podwyszynska, 2012).

### III. LITERATURA CITADA

- Addai I. K. and P. Scott (2011) Regulation of carbohydrates partitioning and metabolism of the common hyacinth. *Agriculture and Biology Journal of North America* 2(2): 279-297.
- Adelberg J., T. Driesse, S. Halloran and W. C. Bridges (2013) Relationships between nutrients and plant density in liquid media during micropropagation and acclimatization of turmeric. *In Vitro Cellular and Development Biology - Plant* 49:724-736.
- Adelberg J. W., M. P. Delgado, J. T. Tomkins (2010) Spent medium analysis for liquid culture micropropagation of *Hemerocallis* on Murashige and Skoog medium. *In Vitro Cellular and Development Biology - Plant* 46:95-107.
- Ascough, G. D., J. E. Erwin, J. Van Staden (2008a) Reduced temperature, elevated sucrose, continuous light and gibberellic acid promote corm formation in *Watsonia vanderspuyiae*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 95:275-283.
- Ascough G. D., J. E. Erwin, J. Van Staden (2008b) *In vitro* storage organ formation of ornamental geophytes. *Horticultural Reviews* 34:417-445.
- Ascough G. D., P. A. Swart, J. F. Finnie and J. Van Staden (2011) Micropropagation of *Romulea minutiflora*, *Sisyrinchium laxum* and *Tritonia gladiolaris* – Iridaceae with ornamental potential. *South African Journal of Botany* 77: 216-221.
- Askari N., Visser R. G. F. and G. J. De Klerk (2018) Growth of lily bulblets *in vitro*, *Review International Journal of Horticultural Science and Technology*. 5(2): 133-143.
- Bach A. and A. Świdorski (2000) The effect of light quality on organogenesis of *Hyacinthus orientalis* L. *in vitro*. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica* 42:115-120.
- Bach A. and B. Pawlowska (2006) Effect of light qualities on cultured *in vitro* ornamental bulbous plants: *In Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, Vol. II ed. J. A. Teixeira da Silva 271-276, Isleworth, UK: Global Science Books.
- Bach A. and D. Sochacki (2013) Propagation of Ornamental Geophytes: Physiology and Management Systems *In: Ornamental Geophytes from Basic Science to Sustainable Production*. R. Kamenetsky and H. Okubo (Eds.) CRC Press, Boca Raton pp. 261-286.

- Benschop M., R. Kamenetsky, M. Le Nard, H. Okubo and A. A. De Hertogh (2010) The global flower bulb industry: production, utilization and research. *Horticultural Reviews*. 36:1-115.
- Borys M. W., H. Leszczynska-Borys and J. L. Galván (2005) Variants in *Sprekelia formosissima* (L.) Heber: *In* 51<sup>st</sup> Annual Meeting – Interamerican Society for Tropical Horticulturae. pp. 10-14.
- Bridgen, M. P. (2012) Introduction and development of new ornamental geophytes. *In* *Ornamental Geophytes: From Basic Science to Sustainable Production*, R. Kamenetsky and H. Okubo, eds. (Boca Raton, FL, USA: CRC Press), p.123–130.
- Cavallaro, V., A. Pellegrino, R. Muleo and I. Forgione (2022) Light and plant growth regulators on *in vitro* proliferation. *Plants* 7(11):1-45. <https://doi.org/10.3390/plants11070844>.
- Cázarez P. M. R. M. Andrade, M. A. Villegas, T. I. Alia, T. O. G. Villegas and M. V. López (2010) *In vitro* propagation of *Sprekelia formosissima* Herbert, a wild plant with ornamental potential. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 3(33):197-203.
- Cheesman L., J. J. Finnie, and J. Van Staden (2010) *Eucomis zambesiaca* Baker: factors affecting *in vitro* bulblet induction. *South African Journal of Botany* 3(76):543–549. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.04.004>.
- Chen J. and M. Ziv (2005) The effect of storage condition on starch metabolism and regeneration potentials of twin-scales and inflorescence stem explants of *Narcissus tazetta*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 41: 816-821
- Chopra J., N. Kaur and A. K. Gupta (2007) Sustained activities of carbon metabolizing enzymes determine seed size in *Vigna radiata* (mungbean). *Current Science-Bangalore* 92:1420-1424.
- Cortez E. P. (2014) Bulbos de flor: un potencial interesante. *Oficina de Estudios y Políticas Agrarias*. <https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/articulos/bulbos-de-flor-un-potencial-interesante>
- Cruz-Duque A. A., E. Tapia-Campos, J. M. Rodríguez-Domínguez and R. Barba-Gonzalez (2019) Research on native ornamental species from Mexico. *Acta Horticulturae* 1240: 1-12. DOI: 10.17660/ActaHortic.2019.1240.1

- De Klerk G. J. (2012) Micropropagation of bulbous crops: Technology and present state. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 6 (Special issue):1-8.
- Dietze, M. C., A. Sala, M. S. Carbone, C. I. Czimczik, J. A. Mantooth, A. D. Richardson and R. Vargas (2014) Nonstructural carbon in woody plants. *Annual Review of Plant Biology* 65: 667 – 687
- Dole J. M. (2003) Research approaches for determining cold requirements forcing and flowering of geophytes. *HortScience* 38:341-346.
- Economou A. S. and P. E. Read (1987) Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. *HortScience* 22:751-754.
- Gao S., Y. Zhu, L. Zhou, X. Fu, T. Lei, Q. Chen, X. Yu, Y. Zhou, W. Li, J. Hu, D. Hu and W. Si (2018) Sucrose signaling function on the formation and swelling of bulblets of *Lilium sargentiae* E.H. Wilson. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 135:143-153. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1451-4>
- George E. F. and P. D. Sherrington (1984) *Plant propagation by tissue culture: a handbook and directory of commercial laboratories*. Exegetics Limited, Basingstoke.
- Gude H. and J. Verbruggen (2000) Physiological markers for lily bulb maturity. *Acta Horticulturae* 517:343-350.
- Gul F., W. Shahri and I. Tahir (2020a) Bulbous Ornamentals: Role and Scope in the Floriculture Industry *In: The Global Floriculture Industry. Shifting Directions, New Trends and Future Prospects*, K. R. Hakeem Ed. 15-38 p.
- Gul J., Z. Zhen, W. Yiru and L. Yingmin (2020b) Transcriptome analysis of carbohydrate metabolism genes and molecular regulation of sucrose transport gene *LoSUT* on the flowering process of developing oriental hybrid lily 'Sorbonne' bulb". *International Journal of Molecular Sciences* 21(9): 3092. <https://doi.org/10.3390/ijms21093092>
- Hong J. and A. K. Lee (2012) Micropropagation of *Cyrtanthus* 'Orange Gem' x *C. eucallus* hybrid. *Scientia Horticulturae* 142: 174-179.
- Hoshino T. and J. L. Cuello (2006) Designing the lighting environment for somatic embryogenesis *In: Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, Vol. II, ed. J. A. Teixeira da Silva, Isleworth, UK: Global Science Books. pp. 295-298.
- Hosseini, R, M. Moradnejad, E. Nezami-Alanagh, S. Ashrafi, and F. Ghane-Golmohammadi (2013) Somatic embryogenesis and bulblet production in *Narcissus papyraceus* cv. Shirazi: effect of plant growth regulators, light

- intensity, sucrose concentration, methyl jasmonate and anti-gibberellins. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding 2:27-34.
- Ilczuk A., T. Winkelmann, S. Richartz, M. Witomska and M. Serek (2005) *In vitro* propagation of *Hippeastrum x chmielii* Chm. – influence of flurprimidol and the in solid medium and in temporary immersion systems. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 83: 339-346.
- Ii K., H. Okubo and T. Matsumoto (2002) Control of bulb dormancy in hyacinth - A molecular biological approach. Acta Horticulturae. 570: 241-246.
- Ishimori T., Y. Niimi and D. S. Han (2007) Benzyladenine and low temperature promote phase transition from juvenile to vegetative adult in bulblets of *Lilium x formolongi* 'White Aga' cultured *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 88: 313-318
- Jeon J. S., N. Ryoo, T. Hahn R., H. Walia and Y. Nakamura (2010). Starch biosynthesis in cereal endosperm. Plant Physiology Biochemistry 48:383-392. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.03.006>.
- Ji Q., J. P. Vincken, L. C. Suurs and R. G. Visser (2003) Microbial starch-binding domains as a tool for targeting proteins to granules during starch biosynthesis. Plant Molecular Biology 51:789-801.
- Kamenetsky R. (2017) Development and utilization of ornamental geophytes: Research challenges and sustainable production. Acta Horticulturae 9-16.
- Kamenetsky R and Okubo H (2013) Ornamental Geophytes. From Basic Science Sustainable Production (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b12881>
- Karaguzel O., A. Kaya, B. Biner and K. Aydinsakir (2012) *In vitro* propagation of native *Ornithogalum* species in West Mediterranean region of Turkey. African Journal of Agricultural Research. 7: 2669-2673.
- Kim, Y., P. Hasegawa, and R. Bressan (1981) *In vitro* propagation of hyacinth [*Hyacinthus orientalis*]. HortScience. 5(16):645–647. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.16.5.645>.
- Koetle M. J., J. F. Finnie and J. Van Staden (2010) *In vitro* regeneration in *Dierama erectum* Hillary. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 103: 23-31.
- Kulkarni M. G., S. G. Sparg and J. Van Staden (2005) Temperature and light requirements for seed germination and seedling growth of two medicinal Hyacinthaceae species. South African Journal of Botany 71:349-353.

- Kumar, S., J. Kanwar, and D. Sharma (2006) *In vitro* propagation of *Lilium*. *Advances in Horticultural Science* 2(20):181–188.
- Kumar S., M. Kashyap, and D. R. Sharma (2005) *In vitro* regeneration and bulblet growth from lily bulb scale explants as affected by retardants, sucrose and irradiance. *Biologia Plantarum* 49(4):629-632.
- Langens-Gerrits M., G. J. De Klerk and A. Croes (2003) Phase change in lily blublets regenerated *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 119(4):590-597.
- Lavrynenko Y., R. Vozhegova, H. Balashova, O. Kotova and B. Kotov (2016) Formation of potato microtubers *in vitro* depending on temperature and light intensity. *Agricultural Science and Practice* 3(3):73-78.
- Lekamge, D., T. Sasahara, S. I. Yamamoto, M. Hatamoto, T. Yamaguchi and S. Maki (2021) Effect of enhanced CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> on improved *in vitro* growth of potato. *Plant Biotechnology* 38(4):401-408.
- Li J., S. Seng, D. Li, F. Zhang, Y. Liu, T. Yao, J. Liang, M. Yi and J. Wu (2021) Antagonism between abscisic acid and gibberellin regulates starch synthesis and corm development in *Gladiolus hybridus*. *Horticulture Research* 8: 155.
- Li X. Y., C. X. Wang, J. Y. Cheng, J. Zhang, A. T. Jaime, X. Y. Liu, X. Duan, T. L. Li, H. M. Sun (2014) Transcriptome analysis of carbohydrate metabolism during bulblet formation and development in *Lilium davidii* var. *unicolor*. *BMC Plant Biology* 14:358. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0358-4>
- Lian, M. L., D. Chakrabarty and K. Y. Paek (2003) Bulblet formation from bulb scale segments of *Lilium* using bioreactor system. *Biologia Plantarum* 46:199-203.
- Lin Y., J. Li, B. Li, T. He and Z. Chun (2011) Effects of light quality on growth and development of protocorm – like bodies of *Dendrobium officinale* *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 105(3): 329–335.
- Ma, S., Y. X. Li, X. Li, X. L. Sui and Z. X. Zhang (2019) Phloem unloading strategies and mechanisms in crop fruits. *Journal Plant Growth Regulation*. 38: 494-500.
- Madubanya L. A., N. P. Makunga, C. W. Fennell (2006) *Dierama luteoalbidum*: Liquid culture provides an efficient system for the *ex situ* conservation of an endangered and valuable plant. *South African Journal of Botany* 72: 584-588.
- Malhotra H., Vandana, S. Sharma, R. Pandey (2018) Phosphorus Nutrition: Plant Growth in Response to Deficiency and Excess. In: M. Hasanuzzaman, M. Fujita, H. Oku, K. Nahar, B. Hawrylak-Nowak (eds) *Plant Nutrients and Abiotic*

- Stress Tolerance. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-9044-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-10-9044-8_7)
- Martínez V. J., A. Sala, D. Asensio, L. Galiano, G. Hoch, S. Palacio, Piper F. I. and Lloret, F. (2016). Dynamics of non-structural carbohydrates in terrestrial plants: a global synthesis. *Ecological Monographs* 86(4): 495-516.
- Miler N., D. Kulus, A. Woźny, D. Rymarz, M. Hajzer, K. Wierzbowski, R. Nelke and L. Szeffs (2018) Application of wide-spectrum light-emitting diodes in micropropagation of popular ornamental plant species: A study on plant quality and cost reduction. *In Vitro Cellular Development Biology - Plant* 55: 99–108.
- Naik P. S. and D. Sarkar (1997) Influence of light-induced greening on storage of potato microtuber. *Biologia Plantarum* 39:31-34.
- Nielsen T. H., A. Krapp, U. Roper-Schwarz and M. Stitt (1998) The sugar-mediated regulation of genes encoding the small subunit of Rubisco and the regulatory subunit of ADP glucose pyrophosphorylase is modified by phosphate and nitrogen. *Plant Cell & Environment* 21:443-454.
- Pelkonen V. P. and A. Kauppi (1999) The effect of light and auxins on the regeneration of lily (*Lilium regale* Wil.) cells by somatic embryogenesis and organogenesis. *International Journal of Plant Sciences* 160:483-490.
- Pfister B. and S. C. Zeeman (2016) Formation of starch in plant cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73(14):2781-807. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2250-x>.
- Podwyszynska M and D. Sochacki (2010) Micropropagation of tulip: production of virus-free stock plants. *In: Jain SM, Ochatt SJ (Eds.) Protocols for in Vitro Propagation of Ornamental Plants, Methods in Molecular Biology (Springer Protocols)* 589, Humana Press/Springer, New York, US, pp. 243-256
- Podwyszynska M (2012) The Mechanisms of *in Vitro* Storage Organ Formation in Ornamental Geophytes. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 6(1):9-23.
- Qu J., S. Xu, Z. Zhang, G. Chen, Y Zhong, L. Liu, R. Zhang, J. Xue and D. Guo (2018) Evolutionary, structural and expression analysis of core genes involved in starch synthesis. *Scientific Reports* 8(1):1-16. DOI:10.1038/s41598-018-30411-y
- Ramage C.M. and R. R. Williams (2002) Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cellular and Development Biology - Plant* 38:116-124.

- Ranwala A. P. and Miller W. B. (2008) Analysis of nonstructural carbohydrates in storage organs of 30 ornamental geophytes by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *New Phytologist* 180: 421-433.
- Rice L. J., J. F. Finnie and J. Van Staden (2011) *In vitro* bulblet formation of *Brunsvigia* from twin-scales. *South African Journal of Botany* 77: 305-312.
- Rice R., P. Alderson and N. Wright (1983) Induction of bulbing of tulip shoots *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 20: 377-390.
- Riou-Khamlichi C., R. Hunley, A. Jacquard, J. A. Murray (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* 283, 1541-1544
- Rodríguez-Falcón M., J. Bou and S. Prat (2006) Seasonal control of tuberization in potato: Conserved elements with the flowering response. *Annual Review of Plant Biology* 57:151-180.
- Ruan Y. L. (2014) Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annual Review of Plant Biology* 65:33-67. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040251>
- Skoric M., S. Živkovic, J. Savic, B. Šiler, A. Sabovljevic, S. Todorovic and D Grubišic (2012) Efficient one-step tissue culture protocol for propagation of endemic plant, *Lilium martagon* var. *cattaniae* Vis. *African Journal of Biotechnology* 11: 1862-1867.
- Stein O. and D. Granot (2019) An overview of sucrose synthases in plants. *Frontiers in Plant Science* 10: 95.
- Swart P. A., M. G. Kulkarni, M. W. Bairu, J. F. Finnie, J. Van Staden (2012) Micropropagation of *Romulea sabulosa* Schltr. ex Beg. A potential ornamental plant. *Scientia Horticulturae* 135: 151-156
- Seabrook, J. E. A. (2005) Light effects on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum*) *in vitro*: A review. *American Journal of Potato Research* 82: 353–367. <https://doi.org/10.1007/BF02871966>
- Streb S. and S. C. Zeeman (2012) Starch metabolism in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book* 10:1-33. <http://dx.doi.org/10.1199/tab.0160>
- Sun H., J. T. Silva, Y. Li and L. Tianlai (2007). Effects of Low Temperature on Dormancy Release in Lily Bulbs. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 1(1):41-45.

- Tapia-Campos E., J. M. Rodríguez-Domínguez, M. M. Revuelta-Arreola, M. Van T. Jaap and R. Barba-González (2012) Mexican Geophytes II. The Genera *Hymenocallis*, *Sprekelia* and *Zephyranthes*. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 6(Special issue 1):129-139.
- Ulrich, M. R.; Davies, F. T. Jr.; Koh, Y.C.; Duray, S. A. and Egilla, J. N. 1999. Micropropagation of *Crinum* 'Ellen Bosanquet' by tri-scales. *Science Horticulture*. 1-2(82):95-102. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(99\)00037-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00037-0).
- Uranbey S. (2010) *In vitro* bulblet regeneration from immature embryos of *Muscari azureum*. *African Journal of Biotechnology* 9: 5121-5125.
- Vance C. P., C. Uhde-Stone, D. L. Allan (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157(3):423-47.
- Viola R., A. G. Roberts, S. Haupt, S. Gazzani, R. D. Hancock, N. Marmirili, Machray G. C., K. J. Oparka (2001) Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. *Plant Cell* 13: 385-398.
- Witomska M and A. J. Łukaszewska (1997) Bulblet regeneration *in vitro* from different explants of *Fritillaria imperialis*. *Acta Horticulturae*. 430:331-338.
- Wu Y., Z. Ren, C. Gao, M. Sun, S. Li, R. Min, J. Wu and. D Li (2021) change in sucrose cleavage pattern and rapid starch accumulation govern lily shoot-to-bulblet transition *in vitro*. *Frontiers in Plant Science* 11: 1-15.
- Xu R. Y., Y. Niimi and D. S. Han (2006) Changes in endogenous abscisic acid and soluble sugars levels during dormancy release in bulbs of *Lilium rubellum*. *Scientia Horticulturae* 111:68-72.
- Yang, L., K. S. Wen, X. Ruan, Y. X. Zhao, F. Wei and Q. Wang (2018) Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*. 4(23):1-26. <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>.

## IV. RESULTADOS

### CAPÍTULO I

#### LA LUZ PROMUEVE LA BULBIFICACIÓN *in vitro* DE *Sprekelia formosissima*.

##### Resumen

*Sprekelia formosissima* es una geófito ornamental que se propaga por división de bulbos ya que su obtención por semilla lleva hasta cuatro años. La micropropagación es una opción para producir bulbos que crecen y acumulan carbohidratos de manera diferenciada bajo distintas condiciones de luz y en función de la especie. En 2022, se evaluó el crecimiento *in vitro* de bulbos de *S. formosissima* con 0, 30, 60, 120 y 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz. Los bulbos se cultivaron en medio MS con 4 % de sacarosa y fotoperiodo de 16 h. A los 80 días se midió número, color, clorofila y longitud de hojas, peso fresco y seco de hojas y bulbos, diámetro y largo de bulbos. Se midieron los azúcares solubles totales, azúcares reductores, sacarosa, fructosa en hojas y además almidón en bulbos. Para determinar almidón se probaron 4 y 8 U de amiloglucosidasa y  $\alpha$ -amilasa con 6, 12 y 24 h de digestión. Con los datos se realizó un ANDEVA y la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). Con 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  aumentó el peso fresco (119.36 mg), seco (33.14 mg) y diámetro de bulbo (0.39 cm), número de hojas (2.25), clorofila a, b, total (0.71, 0.21 y 0.92 mg/g peso fresco, respectivamente) y almidón en bulbos (146.01 mg/g peso fresco), estas variables disminuyeron en oscuridad. La intensidad alta de luz *in vitro* incrementa la biomasa y almidón en bulbos de *S. formosissima* que se estimó con 8 U de amiloglucosidasa y  $\alpha$ -amilasa y 24 h de digestión.

Palabras clave: micropropagación de geófitas, intensidad de luz, carbohidratos.

## LIGHT PROMOTES *in vitro* BULBIFICATION OF *Sprekelia formosissima*.

### Abstract

*Sprekelia formosissima* is an ornamental geophyte that propagates by dividing bulbs since obtaining them by seed takes up to four years. Micropropagation is an option to produce bulbs that grow and accumulate carbohydrates differently under different light conditions and depending on the species. In 2022, the *in vitro* growth of *S. formosissima* bulbs with 0, 30, 60, 120 and 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of light was evaluated. The bulbs were grown in MS medium with 4% sucrose and a photoperiod of 16 h. At 80 days, the number, color, chlorophyll and length of leaves, fresh and dry weight of leaves and bulbs, diameter and length of bulbs were measured. Total soluble sugars, reducing sugars, sucrose, fructose in leaves and starch in bulbs were measured. To determine starch, 4 and 8 U of amyloglucosidase and  $\alpha$ -amylase with 6, 12 and 24 h of digestion were tested. An ANDEVA and Tukey's test were performed with the data ( $p < 0.05$ ). With 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  the fresh weight (119.36 mg), dry weight (33.14 mg) and bulb diameter (0.39 cm), number of leaves (2.25), chlorophyll a, b, total (0.71, 0.21 and 0.92 mg/g fresh weight, respectively) and starch in bulbs (146.01 mg/g fresh weight) increased, these variables decreased in darkness. High light intensity *in vitro* increases biomass and starch in *S. formosissima* bulbs, which was estimated with 8 U of amyloglucosidase and  $\alpha$ -amylase and 24 h of digestion.

Keywords: geophytes micropropagation, light intensity, carbohydrates.

## Introducción

Las plantas geófitas ocupan un lugar importante en la horticultura ornamental, se usan como flor de corte, planta en maceta, jardinería y paisajismo (Zhao *et al.*, 2022). Los géneros de mayor importancia en la industria florícola son *Tulipa*, *Lilium*, *Narcissus*, *Gladiolus*, *Hyacinthus*, *Crocus* e *Iris*; además de *Freesia*, *Ornithogalum*, *Hippeastrum*, *Allium* y *Muscari*, aunque la saturación del mercado con estas flores y la demanda de los consumidores por nuevas variedades ha estimulado el interés por evaluar la flora nativa como fuente de cultivos ornamentales (Kamenetsky, 2017).

Una opción es *Sprekelia formosissima* (L.) Herbert, que se conoce como lirio azteca y se distribuye desde el norte (Chihuahua) al sur de México (Oaxaca). Es una planta geófita herbácea perenne que presenta bulbos globosos tunicados que producen un tallo floral (raramente dos o tres) que puede alcanzar 75 cm, regularmente con una flor de diferentes tonos de rojo de hasta 20 cm (Cruz-Duque *et al.*, 2019).

La propagación tradicional de *Sprekelia formosissima* es por división de bulbos, ya que obtener plantas con flores a partir de semilla puede llevar hasta cuatro años (Borys *et al.*, 2005), además la propagación vegetativa es limitada a la producción de uno o ningún brote por año. Por esto, las técnicas de propagación *in vitro* son una alternativa para la propagación masiva de esta especie en la que se pueden obtener hasta 96 brotes en seis meses a partir de un solo bulbo (Cázarez *et al.*, 2010). Sin embargo, el reto en la micropropagación de esta especie bulbosa es la bulbificación (formación y crecimiento de bulbos), ya los bulbillos producidos *in vitro* que crecen lo suficiente para lograr un estado de desarrollo adulto, brotan rápido y forman tallos, hojas y flores; por el contrario, los bulbos de menor tamaño pasan por un estado juvenil, que en el caso de lilis forman únicamente hojas en roseta sin producir flores (De Klerk, 2012).

El crecimiento de la planta posterior a la brotación está relacionado con la acumulación de almidón y azúcares solubles como sacarosa, glucosa y fructosa durante la bulbificación (Podwyszynska, 2012). La acumulación de carbohidratos en bulbosas ornamentales puede ser afectada por las variables ambientales de

incubación como la luz (intensidad, calidad y fotoperiodo), que modula el crecimiento y desarrollo de las plantas cultivadas *in vitro* (Yang *et al.*, 2018).

De acuerdo con Sevgin y Karatas (2022) la intensidad de luz utilizada en la micropropagación de especies geófitas varía de 30 a 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  aunque otros estudios indican que la oscuridad promueve la formación de bulbos *in vitro* ya que simula las condiciones subterráneas de crecimiento naturales (Ulrich *et al.*, 1999; Rice *et al.*, 2011). En *Narcissus tazzeza* L., Rahimi *et al.* (2020), estudiaron el efecto de la incubación con fotoperiodo de 16/8 horas luz /oscuridad y oscuridad, quienes consignaron que el tratamiento con luz (40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) propició mayor número de bulbos ( $13.5 \pm 1.44$ ), número ( $6.2 \pm 0.87$ ) y largo de hojas ( $0.86 \pm 0.46$ ).

Asimismo, la oscuridad inhibió completamente la formación de bulbos en *Eucomis zambesiaca* y el fotoperiodo de 8 horas de luz promovió su formación (Cheesman *et al.*, 2010). Por el contrario, en *Hyacinthus orientalis* (Kim *et al.*, 1981) y *L. longiflorum* (Kumar *et al.*, 2006) se reportó un número de brotes mayor en condiciones de oscuridad.

Estos datos muestran que los efectos de la luz y la oscuridad en la producción *in vitro* de bulbos en las plantas geófitas deben ser estudiados en cada especie para determinar las condiciones óptimas para la producción de bulbos de calidad. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de la intensidad de luz sobre 1) el crecimiento *in vitro* de bulbos de *Sprekelia formosissima* y 2) la concentración de almidón, azúcares solubles totales, azúcares reductores, sacarosa y fructosa en los bulbos.

## **Materiales y métodos**

### **Material vegetal**

Las semillas de *Sprekelia formosissima* se colectaron en la localidad de Tejerías en Uruapan, Michoacán ( $19^{\circ} 23' 89''$  N y  $102^{\circ} 00' 22.82''$  O). Éstas se sumergieron en solución con 1 mg L<sup>-1</sup> de Tecto® (tiabendazol 60 %) y 60 gotas de Microdin® (plata ionizada 0.35 %) por 15 minutos; luego se enjuagaron tres veces

con agua estéril. La desinfección se efectuó con una solución de hipoclorito de sodio (2.1 %) durante 15 minutos y tres enjuagues con agua estéril. Después, las semillas se germinaron en medio Murashige y Skoog (1962) con 100 mg L<sup>-1</sup> mioinositol, 0.4 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 6 g L<sup>-1</sup> de agar (medio basal) más 3 % de sacarosa. El pH del medio se ajustó a 5.8, la incubación de los cultivos fue a 25 °C, con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad y radiación fotosintéticamente activa de 60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> con lámparas de luz fluorescente blanca de 75 W. Las plántulas con bulbillos se obtuvieron a las ocho semanas.

### **Tratamientos y diseño experimental para evaluar el efecto de la intensidad de luz**

A los bulbillos se les quitó la parte apical mediante un corte transversal, a la parte basal se le hizo un corte longitudinal para promover la propagación de nuevos bulbillos. Estos explantes se cultivaron en frascos de 100 mL de capacidad con 25 mL de medio Murashige y Skoog con 4 % de sacarosa, 2 mg L<sup>-1</sup> de benciladenina (BA) y 2 mL L<sup>-1</sup> de preservador para cultivo de tejidos vegetales (PPM por sus siglas en inglés con 0.135 % de 5-cloro-2-metil-3(2H)-isotiazolona y 0.0412 % de 2-metil-3(2H)-isotiazolona).

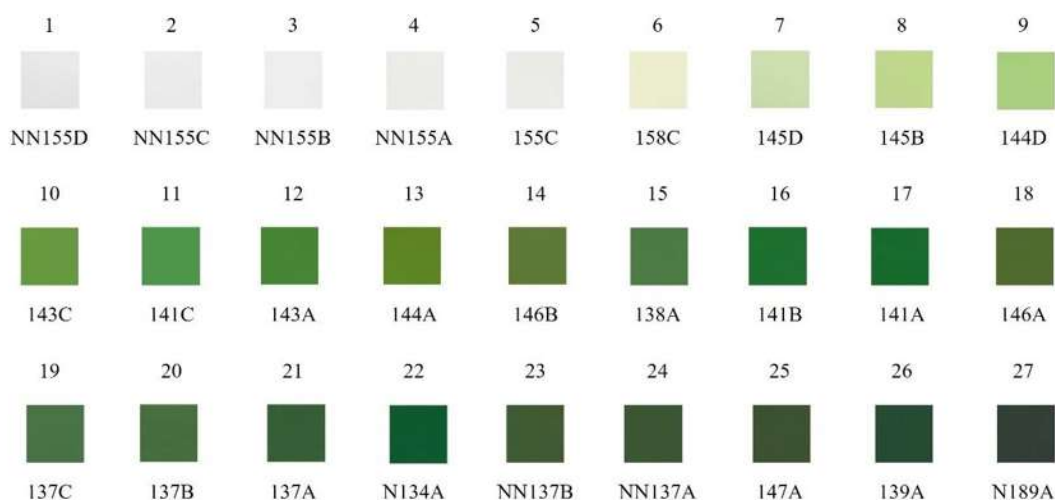
A los 60 días se seleccionaron bulbillos de 0.2 a 0.3 cm de diámetro, se colocaron en medio basal y se incubaron en oscuridad y con diferente intensidad de luz (30, 60, 120 y 130 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) con fotoperiodo de 16/8 h oscuridad/luz. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar y la unidad experimental consistió en un frasco con dos bulbillos de *S. formosissima*.

A los 80 días después de establecido el experimento (dde), en las hojas se evaluó la concentración de clorofila, color, número y longitud de la hoja más larga. En bulbos se midió ancho, longitud y contenido de almidón. En bulbos y hojas se registró peso fresco, peso seco y contenido de carbohidratos solubles (solubles totales, reductores, sacarosa y fructosa).

Para medir clorofila, las hojas se colocaron en 5 mL de N,N dimetilformamida en oscuridad por 72 horas a 4 °C, después se tomó 1 mL del solvente y se midió la

absorbancia en un espectrofotómetro (Jenway 6305) a 664 y 647 nm, con estos datos y las funciones clorofila a=  $12.70(A_{664})-2.79(A_{647})$ , clorofila b=  $20.70(A_{647})-4.62(A_{664})$  y clorofila total=  $17.90(A_{647}) - 8.08(A_{664})$  se calculó la concentración de clorofila en  $\text{mg L}^{-1}$  y con el peso de muestra en  $\text{mg/g}$  peso fresco (Porra *et al.*, 1989).

Para el color se utilizaron las cartas de colores de la Royal Horticultural Society (RHSCC sexta edición) con las que se estableció una escala con valores consecutivos de 1 a 27 que corresponden al número de colores registrados desde blanco (NN155D) a verde con diferentes tonalidades claras a oscuras (N189A) (Figura 1).



**Figura 1.** Número consecutivo asignado y nombre de colores de la Royal Horticultural Society registrados en hojas de *S. formosissima* propagada *in vitro* con diferente intensidad de luz.

Para determinar los carbohidratos solubles se utilizó una muestra de aproximadamente 50 mg de tejido pulverizado congelado, a la que se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de etanol 80 %, luego la muestra se calentó a 80 °C por 30 minutos con agitación cada 10 minutos y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos para separar y recuperar el sobrenadante del sedimento, este procedimiento se repitió tres veces a partir de la adición del etanol 80 %. A partir del sobrenadante, los azúcares solubles totales se determinaron por el método de fenol – ácido sulfúrico (Rover *et al.*, 2013), azúcares reductores por Somogyi-Nelson (Maldonade *et al.*, 2013) y sacarosa y fructosa por el método propuesto por Seliwanoff (Quesada, 2007). La

determinación de clorofila se realizó con tres repeticiones por tratamiento, los carbohidratos no estructurales con cuatro, número y longitud de hoja más larga con diez y para el resto de las variables se midieron siete repeticiones por tratamiento.

### **Estandarización de la técnica para la determinación enzimática de almidón en bulbos de *Sprekelia formosissima***

Antes de evaluar el efecto de la intensidad de luz sobre el contenido de almidón en bulbos de *Sprekelia formosissima*, se realizó un ensayo para establecer la concentración de  $\alpha$ -amilasa, amiloglusidasa y el tiempo de digestión óptimos para estimar la concentración de este polisacárido. Para determinar el almidón se utilizó el sedimento descrito en la determinación de carbohidratos solubles, en este caso el lavado con etanol 80 % se realizó tres veces más.

Después de lavar con etanol 80 % el sedimento se secó a 80 °C y se agregaron 200  $\mu$ L de agua destilada estéril, la muestra se calentó a 95 °C por 45 minutos para gelatinizar el almidón y luego se agregaron 300  $\mu$ L de una solución buffer de acetato de sodio 0.2 M (pH 5.4) que contenía  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* (EC 3.2.1.1) y amiloglusidasa de *Aspergillus niger* (EC 3.2.1.3). Se utilizó un arreglo de tratamientos factorial con seis repeticiones para probar dos concentraciones de enzimas (4 y 8 U de cada enzima) y tres tiempos de incubación de la reacción a 37 °C (6, 12 y 24 horas), luego se midió la cantidad de glucosa hidrolizada por el método de Somogyi-Nelson (Maldonade *et al.*, 2013) para estimar el contenido de almidón en la muestra.

### **Análisis estadístico**

La normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos se corroboró con la prueba de Shapiro-Wilks y Levene, respectivamente. Se transformaron las variables clorofila a, clorofila total ( $z^2$ ) y color de hojas [ $\exp(z)$ ], peso fresco, seco y longitud de hoja más larga [ $\log(z + 1)$ ], peso fresco [ $\log \{z + \sqrt{(z + 1)}\}$ ] y seco de bulbo ( $\sqrt{z}$ ), fructosa, azúcares solubles totales en bulbo [ $\log\{z + \sqrt{(z^2 + 1)}\}$ ] y azúcares reductores en hojas y bulbos ( $1/z$ ). Con los datos obtenidos se realizó un análisis de

varianza ( $p \leq 0.05$ ) y la prueba de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) con el programa SAS® OnDemand for Academics (SAS, 2023).

## Resultados y discusión

### Crecimiento y acumulación de biomasa en bulbos

Contrario a lo que ocurre en lilis que se cultiva en oscuridad, el crecimiento *in vitro* de bulbos y el número de hojas formadas en *S. formosissima* se incrementó con la mayor intensidad de luz probada en este experimento ( $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) en comparación con los bulbos cultivados en oscuridad que acumularon la menor cantidad de biomasa y generaron menos hojas (Cuadro 1).

Las plantas cultivadas *in vitro* son generalmente foto-mixotróficas, usan como fuente de carbono la sacarosa del medio de cultivo, aunque pueden satisfacer parte de su demanda mediante fijación fotosintética del  $\text{CO}_2$  disponible en los contenedores donde se cultivan (Badr *et al.*, 2011), es por esto que el incremento de la biomasa en bulbos *S. formosissima* registrado con mayor intensidad de luz puede explicarse por la formación de una mayor cantidad de hojas que en estas condiciones suministran los fotosintatos acumulados en los bulbos que se comportan como órganos demanda y acumulan carbohidratos para formar almidón a partir de los órganos fuente y el medio de cultivo.

En *Narcissus papyraceus* cv. Shirazi, los bulbos almacenan nutrientes e incrementan su diámetro ( $11.43 \pm 0.93$  mm) y longitud ( $19.68 \pm 0.52$  mm) bajo condiciones de intensidad de luz alta ( $108 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y  $90 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa (Hosseini *et al.*, 2013). En bulbos de lilis 'Siberia' cultivados *in vitro*, se reportó un incremento del diámetro del bulbo de 443.70 % cuando se indujo la diferenciación y llenado de bulbo en la oscuridad y de 245.33 % con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad, en comparación con el diámetro inicial de los explantes; el número y longitud de raíces por bulbo fue de 14.53 y 7.31 raíces de 3.68 y 0.79 cm, respectivamente (Zhang y Jia, 2014).

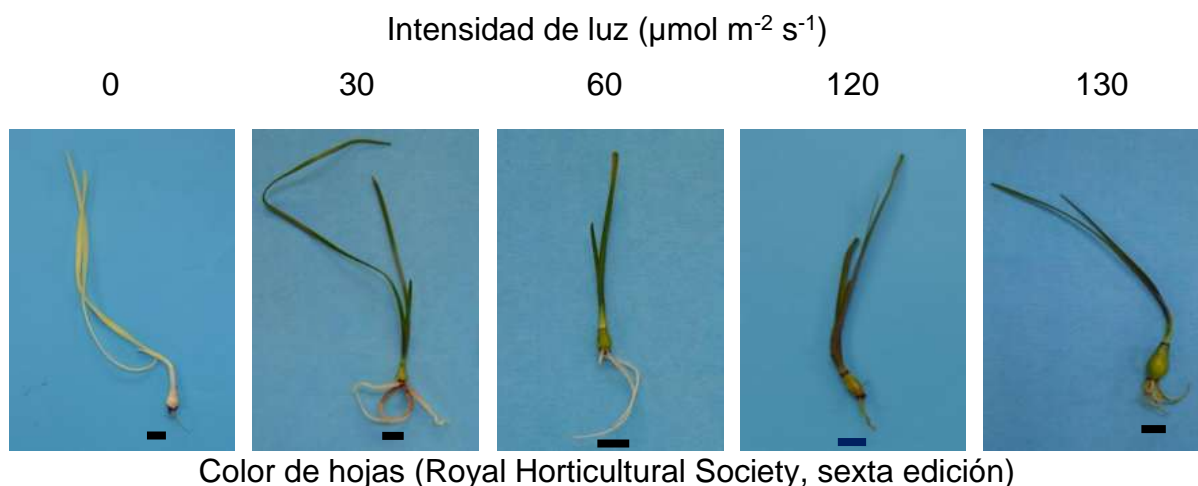
Los bulbos de *S. formosissima* cultivados en la oscuridad desarrollaron en promedio 2 raíces de 0.8 cm de longitud de la raíz más larga, en contraste los bulbos de lilis ‘Siberia’ produjeron un mayor número de raíces con mayor longitud por bulbo en estas condiciones, lo que permitió una mayor absorción de nutrientes del medio de cultivo y el incremento del tamaño del bulbo en la oscuridad.

**Cuadro 1.** Efecto de la intensidad de luz sobre el crecimiento de plántulas de *S. formosissima* propagados *in vitro*.

Intensidad de luz ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Bulbos			Número de hojas
	Diámetro (cm)	Peso fresco (mg)	Peso seco (mg)	
0	0.27 b	47.21 b	6.21 b	1.20 b
30	0.32 ab	64.50 ab	12.35 b	1.75 ab
60	0.37 ab	71.57 ab	13.78 b	1.80 ab
120	0.31 ab	65.93 ab	16.07 b	1.95 ab
130	0.39 a	119.36 a	33.14 a	2.25 a
DSH (0.05)	0.11	61.95	15.51	0.82

Medias con letras iguales en columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). DSH: diferencia significativa honesta.

Las hojas que crecieron a partir de los bulbos de *S. formosissima* cultivados *in vitro* presentaron un color verde intenso en los tratamientos con más luz y una decoloración marcada cuando las plántulas crecieron en la oscuridad (Figura 2), en estas condiciones se registraron las concentraciones más bajas de clorofila a, b y total en hojas con valores 55, 35 y 58 veces menores a los registrados con  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente (Cuadro 2).



**Figura 2.** Color de hojas en plántulas de *S. formosissima* a partir de bulbos propagados *in vitro* con diferente intensidad de luz. La barra en la figura representa 1 cm.

**Cuadro 2.** Efecto de la intensidad de luz sobre la concentración de clorofila y color de hojas de *S. formosissima* cultivada *in vitro*.

Intensidad de luz ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Color	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total
		(mg / g peso fresco)		
0	5.42 c	0.013 c	0.006 c	0.016 c
30	19.42 ab	0.373 b	0.106 bc	0.480 bc
60	18.00 b	0.523 ab	0.133 ab	0.656 ab
120	19.21 ab	0.580 ab	0.133 ab	0.720 ab
130	23.42 a	0.713 a	0.210 a	0.923 a
DSH (0.05)	4.56	0.306	0.100	0.400

Medias con letras iguales en columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). DSH: diferencia significativa honesta.

Los resultados en experimentos con diferentes condiciones de luz muestran que la mayor concentración de clorofila (principal pigmento asociado a la fotosíntesis) está relacionada con la acumulación de materia fresca y seca en los explantes de plantas *in vitro* (Batista *et al.*, 2018), como ocurrió en *S. formosissima* donde la mayor acumulación de biomasa se registró con la intensidad de luz más

alta. También se ha documentado que las plantas bajo estas condiciones pueden producir concentraciones altas de clorofila y carotenoides como mecanismo de protección contra la fotooxidación (Alvarenga *et al.*, 2015), ya que si el exceso de energía absorbida por el aparato fotosintético no es disipado rápidamente puede resultar en fotoinhibición y daño en el centro de reacción fotosintética (Takahashi y Murata, 2008).

La acumulación de clorofila en hojas de *S. formosissima* registrada en este trabajo con la intensidad de luz de  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , podría ser un mecanismo de protección, tal como lo sugieren Alvarenga *et al.* (2015), quienes cultivaron *Achillea millefolium* (asterácea que forma rizoma) *in vitro*, con cinco intensidades de luz, 13, 27, 35, 47 y  $69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y en la que registraron la mayor concentración de clorofila a, b y total (1.18, 0.63 y 1.81 mg / g peso fresco) con la intensidad de luz más alta, pero con el crecimiento vegetativo mayor (número de raíces, longitud de brote y acumulación de materia seca) con  $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

En contraste, la mayor acumulación de biomasa en bulbos de *S. formosissima* con  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz probada en este experimento puede explicarse por el incremento en el número de hojas, clorofila y fotosíntesis que permitió movilizar y acumular en estos órganos una mayor cantidad de fotosintatos generados en las hojas en comparación con los bulbos en la oscuridad que obtuvieron el carbono únicamente de la sacarosa del medio o los bulbos con intensidades de luz más baja que obtuvieron una menor cantidad de carbono mediante la fijación de  $\text{CO}_2$ . Estos resultados demuestran que la respuesta a la intensidad alta de luz es diferente entre las especies y que solo las plantas adaptadas a radiación alta en su medio natural presentan mayor tasa fotosintética y crecimiento bajo estas condiciones *in vitro* (Cavallaro *et al.*, 2022).

### **Estandarización de la concentración de enzimas ( $\alpha$ -amilasa y amiloglucosidasa) y tiempo de digestión *in vitro* para estimar almidón en bulbos de *Sprekelia formosissima***

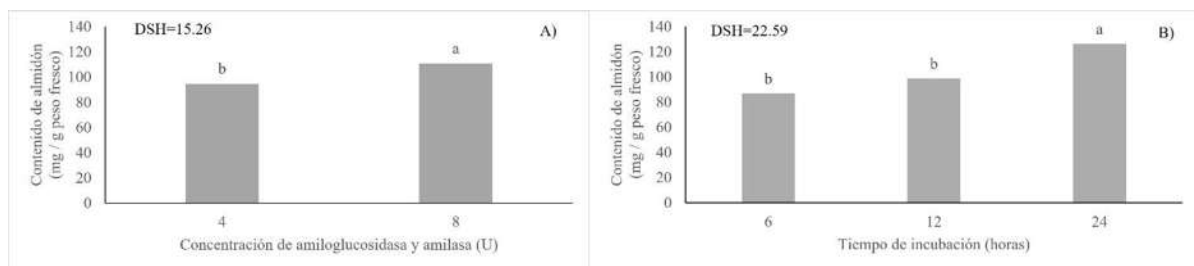
La interacción entre la concentración enzimática y el tiempo de digestión de almidón no fue significativa ( $p \leq 0.05$ ) (Cuadro 2A), aunque de forma independiente, el

mayor grado de hidrólisis de almidón en los bulbillos de *S. formosissima* se registró con 8 U de ambas enzimas,  $\alpha$ -amilasa y amiloglucosidasa, con 110.71 mg/g peso fresco y 24 horas de digestión, con 125.87 mg/g peso fresco (Figura 3). Esta cantidad es 16 y 1.3 veces superior a la cantidad de  $\alpha$ -amilasa y amiloglucosidasa que Smith y Zeeman (2006) sugieren para determinar el contenido de almidón en tejido vegetal con 4 horas de incubación a 37 °C. La mezcla de ambas enzimas fue eficiente para la digestión del almidón en bulbos de *S. formosissima* aunque, algunas investigaciones sugieren usar solo una enzima lo que parece no ser adecuado con base en los resultados de la digestión de almidón de maíz y papa donde se probaron diferentes tiempos de digestión con amiloglucosidasa sola (14 U) y con las enzimas  $\alpha$ -amilasa y amiloglucosidasa juntas (25 y 14 U, respectivamente), la hidrolisis del almidón fue más rápida con ambas enzimas y a las 24 horas casi todo el almidón del maíz fue hidrolizado a glucosa mientras que un tercio del almidón de papa permaneció sin hidrolizar (Zhang *et al.*, 2013).

En *Lilium lancifolium* se determinó el contenido de almidón en bulbos maduros y bulbillos recién formados con 50 U de  $\alpha$ -amilasa con un tiempo de digestión de 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 h. El almidón de los bulbillos mostró menor resistencia a la digestión con el porcentaje mayor de almidón (40 %) registrado a las 24 h comparado con bulbos en los que se registró cinco veces menos almidón en este mismo tiempo. Estas variaciones de concentración enzimática y tiempo de digestión en la determinación del contenido de almidón en tejido vegetal se deben a las diferencias en las características de este polisacárido, entre ellas el tamaño del gránulo, la proporción de amilosa y amilopectina y edad del tejido (Yu *et al.*, 2015).

En los bulbillos de *Lilium lancifolium*, el tamaño del gránulo de almidón es pequeño, además tiene una forma cóncava-convexa con orificios que lo proveen de una mayor relación superficie-volumen que hace más eficiente la digestión enzimática en comparación con los gránulos de almidón en los bulbos que son de mayor tamaño y de forma esférica u ovalada. Los gránulos de almidón presentes en el tejido de las distintas especies usualmente difieren en tamaño, estructura, propiedades térmicas y digestión (Yu *et al.*, 2015).

Además, el grado de hidrólisis del almidón depende de la conservación de su estructura y es más alto si se somete a calentamiento y agitación que permite romper los gránulos, previo a la reacción enzimática con  $\alpha$ -amilasa y amiloglucosidasa (Zhang *et al.*, 2013) como se hizo en este ensayo. Los resultados encontrados en este trabajo y los datos reportados en la determinación de almidón en los órganos de reserva de *Lilium lancifolium* (Yu *et al.*, 2015) sugieren que el tamaño de los gránulos de almidón en los bulbillos de *S. formosissima* propagados *in vitro* es pequeño en este tejido joven, lo que permite una digestión del almidón más eficiente en el periodo de digestión más prolongado de 24 h con 8 U de  $\alpha$ -amilasa y amiloglucosidasa.



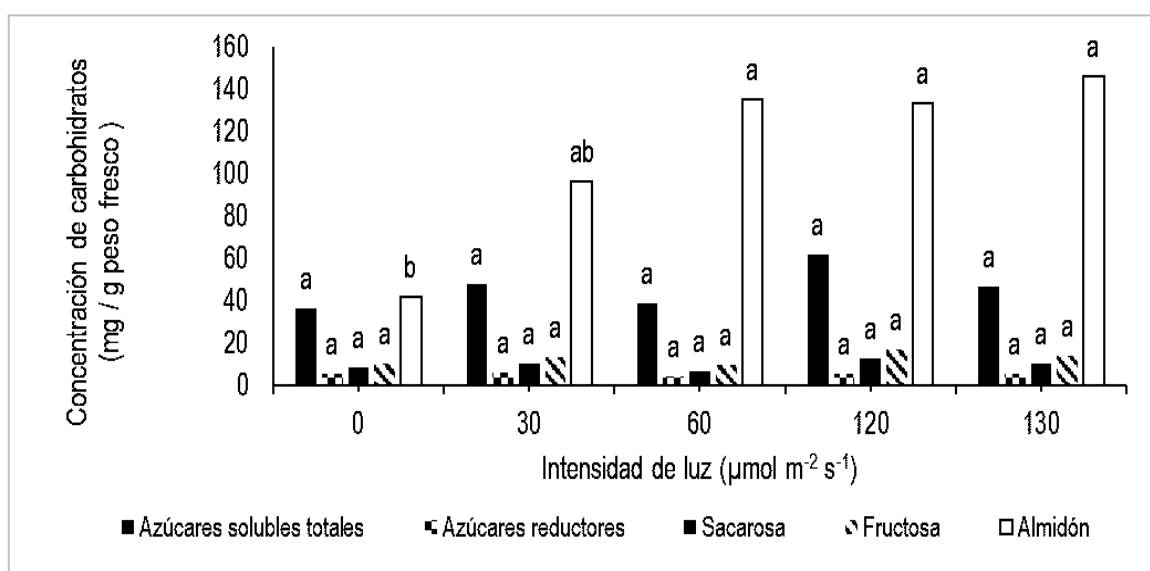
**Figura 3.** Concentración de enzimas y tiempo de incubación para estimar almidón en bulbos de *S. formosissima* propagados *in vitro*. A) Efecto de la concentración de enzimas (amiloglucosidasa y  $\alpha$ -amilasa) y B) tiempo de digestión a 37 °C. Medias con letras iguales sobre las barras no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). DSH: diferencia significativa honesta.

### Carbohidratos no estructurales en hojas y bulbos

El contenido de almidón se incrementó 225, 221 y 251 % en los bulbos que crecieron en 60, 120 y 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz, respectivamente en comparación con los bulbos cultivados en la oscuridad (Figura 4). La síntesis de carbohidratos de reserva, incluido el almidón, está altamente relacionada con la última etapa en la formación de órganos de almacenamiento en las plantas geófitas, que se caracteriza por el crecimiento de estos órganos (Podwyszynska, 2012) y el almacenamiento de almidón en grandes cantidades, lo que asegura una fuente de carbono y suministro de energía durante condiciones no favorables y una brotación y crecimiento

reproductivo rápidos en condiciones ambientales favorables (Ranwala y Miller, 2008).

En este experimento, el incremento en la acumulación de almidón en bulbos de *S. formosissima in vitro* por efecto de una mayor intensidad de luz, coincide con lo reportado en bulbos de *Lachenalia 'Rupert'* en los que la luz blanca ( $30 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y azul promovieron la acumulación de almidón, mientras que la oscuridad y la luz roja disminuyeron la concentración de este carbohidrato con concentraciones de 4.7 a 105 mg /g de peso seco (Bach *et al.*, 2015). Estos resultados sugieren que conocer la intensidad de luz máxima adecuada en la micropropagación puede ser un elemento importante en la estrategia para incrementar el contenido de almidón y el tamaño los bulbillos de *S. formosissima* obtenidos por esta técnica.



**Figura 4.** Efecto de la intensidad de luz sobre el contenido de carbohidratos no estructurales en bulbos de *S. formosissima* propagados *in vitro*. Medias con letras iguales sobre cada tipo de barra no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) con diferencia significativa honesta (DSH) para azúcares solubles totales = 33.06; azúcares reductores = 3.30; sacarosa = 6.38, fructosa = 9.38 y almidón = 68.96.

## Conclusiones

A diferencia del crecimiento *in vitro* de otras especies de geófitas bien caracterizadas, nuestros resultados indican que emular las condiciones de oscuridad en las que se desarrollan normalmente los bulbos no determina la movilización de carbohidratos a estos órganos en *S. formosissima*, lo que impacta en la disminución de biomasa. En cambio, se observó que el desarrollo de tejidos fotosintéticos en presencia de luz fue más favorable para la obtención de bulbos con mayor biomasa y mayor contenido de reservas. Si bien, se observó que los azúcares solubles en el bulbo no fluctuaron en concentración en los diferentes niveles de exposición a luz, la acumulación de almidón se incrementó significativamente en bulbos a medida que aumentó la intensidad de la luz. Esto sugiere que la acumulación de biomasa y almidón en bulbos de *S. formosissima* cultivados *in vitro* están fuertemente regulados por el desarrollo de órganos fotosintéticos y su transición demanda-fuente. Otros determinantes además de la luz, como la condición nutrimental o el desarrollo de raíces, necesitan ser estudiados. Sin embargo, observar que altas intensidades de luz *in vitro* promueven el crecimiento y almacenamiento de almidón en órganos de reserva, puede ser utilizado como una estrategia para inducir la bulbificación en *S. formosissima*.

## Literatura citada

- Alvarenga I. C. A., F. V. Pacheco, S. T. Silva, S. K. V. and J. E. B. P. Pinto (2015) *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2(122):299-308. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0766-7>
- Bach A., A. Kapczyńska, K. Dziurka, and M. Dziurka (2015) Phenolic compounds and carbohydrates in relation to bulb formation in *Lachenalia* 'Ronina' and 'Rupert' *in vitro* cultures under different lighting environments. *Scientia Horticulturae*. 1(188):23-29. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.02.038>.
- Badr A.; P. Angers, and Y. Desjardins (2011) Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 1(107):13-24. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9951-5>

- Batista D. S., S. H. S. Felipe, T. D. Silva, K. M. de Castro, T. C. Mamedes-Rodrigues, N. A. Miranda, A. M. Ríos-Ríos, D. V. Faria, E. A. Fortini, K. Chagas, G. Torres-Silva, A. Xavier, J. D. Arencibia and W. C. Otoni (2018) Light quality in plant tissue culture: Does it matter? *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 3(54):195–215. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9902-5>.
- Borys M. W. H. Leszczynska-Borys and J. L. Galván (2005) Variants in *Sprekelia formosissima* (L.) Herbert. *In: 51<sup>st</sup> Annual Meeting – Interamerican Society for Tropical Horticulturae*. Boca Chica, República Dominicana. 31-37 pp.
- Cavallaro V., A. Pellegrino, R. Muleo and I. Forgione (2022) Light and plant growth regulators on *in vitro* proliferation. *Plants*. 7(11):1-45. <https://doi.org/10.3390/plants11070844>.
- Cázar P. M. R. M. Andrade, M. A. Villegas, T. I. Alia, T. O. G. Villegas and M. V. López (2010) *In vitro* propagation of *Sprekelia formosissima* Herbert, a wild plant with ornamental potential. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 3(33):197-203.
- Cheesman L., J. J. Finnie and J. Van Staden (2010) *Eucomis zambesiaca* Baker: factors affecting *in vitro* bulblet induction. *South African Journal of Botany*. 3(76):543–549. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.04.004>.
- Cruz-Duque A. A., E. Tapia-Campos, J. M. Rodríguez-Domínguez and R. Barba-González (2019) Research on native ornamental species from Mexico. *Acta Horticulturae*. 1240(1):1-12. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1240.1>.
- De Klerk G. J. (2012) Micropropagation of bulbous crops: Technology and present state. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*. 1(6):1-8.
- Hosseini R., M. Moradnejad, E. Nezami-Alanagh, S. Ashrafi, and F. Ghane-Golmohammadi (2013) Somatic embryogenesis and bulblet production in *Narcissus papyraceus* cv. Shirazi: effect of plant growth regulators, light intensity, sucrose concentration, methyl jasmonate and anti-gibberellins. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 2(1):27-34.
- Kamenetsky R. (2017) Development and utilization of ornamental geophytes: Research challenges and sustainable production. *Acta Horticulturae*. 1171(1):9-16. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1171.2>.
- Kim Y., P. Hasegawa and R. Bressan (1981) *In vitro* propagation of hyacinth [*Hyacinthus orientalis*]. *HortScience*. 5(16):645–647. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.16.5.645>.

- Kumar S., J. K. Kanwar and D. R. Sharma (2006) *In vitro* propagation of *Lilium*. *Advances in Horticultural Science* 2(20):181–188.
- Maldonade I. R., P. G. B. Cavalho, N. A. Ferreira, e B. S. F. Moulin (2013) Protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson. Ministério da Agricultura, Pecúaria e Abastecimento, Comunicado Técnico 86 ISSN 1414.9850. Brasília, Brasil. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/81814/1/cot-86.pdf>.
- Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 3(15):473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Podwyszynska M. (2012) The mechanisms of *in vitro* storage organ formation in ornamental geophytes. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*. 1(6):9-23.
- Porra R. J., W. A. Thompson and P. E. Kreidemann (1989) Determination of accurate extinctions coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standars by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics* 3(975):384-394. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(89\)80347-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80347-0).
- Quesada M. S. (2007) Manual de Experimentos de Laboratorio para Bioquímica. EUNED. San José Costa Rica. 148 p.
- Rahimi K. M., H. Rezadoost, R. Heydari and M. H. Mirjalili (2020) Effect of photoperiod and plant growth regulators on *in vitro* mass bulblet proliferation of *Narcissus tazetta* L. (Amaryllidaceae), a potential source of galantamine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1(142):187-199. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01853-y>.
- Ranwala A. P. and W. B. Miller (2008) Analysis of nonstructural carbohydrates in storage organs of 30 ornamental geophytes by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *New Phytologist*. 2(180):421-433. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02585.x>.
- Rice L. J., J. F. Finnie, and J. Van Staden (2011) *In vitro* bulblet production of *Brunsvigia undulata* from twin-scales. *South African Journal of Botany*. 2(77):305–312. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.08.011>.

- Rover M. R., P. A. Johnston, B. P. Lamsal and R. C. Brown (2013) Total water-soluble sugars quantification in bio-oil using the phenol–sulfuric acid assay. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 1(104):194-201. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2013.08.004>.
- SAS Institute Inc. (2023) SAS OnDemand for Academics. Disponible en [https://www.sas.com/en\\_us/software/on-demand-for-academics.html](https://www.sas.com/en_us/software/on-demand-for-academics.html).
- Sevgin N., and M. Karatas (2022) Micropropagation of geophytes (bulbous-tuberous-rhizome plants) *In Mathematics and Natural Science Karapinar*, R. (ed.) Livre de Lyon. Lyon, Francia. 99-121 pp.
- Smith A. M. and S. C. Zeeman (2006) Quantification of starch in plant tissues. *Nature Protocols* 3(1):1342-1345. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.232>.
- Takahashi S. and N. Murata (2008) How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science*. 4(13):178-182. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.01.005>
- Ulrich M. R., F. T. Jr. Davies, Y. C. Koh, S. A. Duray, and J. N. Egilla (1999) Micropropagation of *Crinum 'Ellen Bosanquet'* by tri-scales. *Science Horticulture*. 1-2(82):95-102. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(99\)00037-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00037-0).
- Yang L., K. S. Wen, X. Ruan, Y. X. Zhao, F. Wei, and Q. Wang (2018) Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*. 4(23):1-26. <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>.
- Yu X., J. Zhang, S. Shao, H. Yu, F. Xiong and Z. Wang (2015) Morphological and physicochemical properties of bulb and bulbil starches from *Lilium lancifolium*. *Starch-Stärke*. 5(67):448-458. <https://doi.org/10.1002/star.201400209>.
- Zhang B., S. Dhital and M. J. Michael (2013) Synergistic and antagonistic effects of  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase on starch digestion. *Biomacromolecules*. 6(14):1945-1954, <https://doi.org/10.1021/bm400332a>.
- Zhang M. and G. Jia, G. (2014) The effects of sucrose concentration and light condition on lily's bulblet-in-tube production and inclusion content. *Pakistan Journal of Botany*. 1(46):307-315.
- Zhao Y., C. Liu, J. Sui, J. Liang, J. Ge, J. Li, W. Pan, M. Yi, Y. Du, Y and J. Wu (2022) A wake-up call: signaling in regulating ornamental geophytes dormancy. *Ornamental Plant Research*. 8(2):1-10. <https://doi.org/10.48130/OPR-2022-0008>.

## CAPÍTULO II

### SACAROSA Y FÓSFORO COMO ESTRATEGIA PARA MODIFICAR LA DINÁMICA DEL CARBONO EN BULBOS *in vitro* DE *Sprekelia formosissima*

#### Resumen

En la micropropagación de especies geófitas como *Sprekelia formosissima* se busca la formación de bulbos, que crecen y acumulan carbohidratos en función de los niveles de P y sacarosa en el medio de cultivo. El objetivo del ensayo fue estudiar *in vitro* la acumulación de azúcares solubles y almidón y la actividad de AGPasa, SSS y GBSS en bulbos de *S. formosissima* bajo diferentes concentraciones de sacarosa (3, 5, 7, y 9 %) y fósforo (0.62, 1.25 y 1.87 mmol). Los bulbillos se incubaron por 12 semanas en oscuridad en medio MS con 2 mg L<sup>-1</sup> de BA. En bulbos, se registró la concentración de almidón, fructosa, sacarosa, azúcares solubles totales (AST) y reductores, actividad enzimática (AE) y actividad enzimática específica (AEE) de AGPasa, SSS y GBSS, peso fresco y diámetro, se contaron hojas y raíces, su longitud promedio y peso fresco. Con estos datos se realizó un ANDEVA y la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). Los AST, sacarosa y fructosa se incrementaron con 9 % de sacarosa (15.86, 8.49 y 2.84 mg / g tejido fresco, respectivamente) y el almidón con 7 y 9 % (25.88 y 27.23 mg / g tejido fresco, respectivamente). La AE y AEE de AGPasa incrementaron con 5 % de sacarosa y 1.25 mmol de P. La AE y AEE de SSS y GBSS aumentaron con 9 % de sacarosa y 0.62 y 1.25 mmol de P y con 7 % de sacarosa y 0.62 mmol de P, respectivamente. La AE y AEE de las tres enzimas aumentaron con 7 % de sacarosa. El aumento de P de 1.25 a 1.87 mmol disminuyó la AE y AEE de AGPasa. La sacarosa afecta la acumulación de carbohidratos no estructurales y la actividad de AGPasa, SSS y GBSS en bulbos de *S. formosissima in vitro*.

Palabras clave: metabolismo de carbono en geófitas, sacarosa, carbohidratos no estructurales

## SUCROSE AND PHOSPHORUS AS A STRATEGY TO MODIFY CARBON DYNAMICS IN *Sprekelia formosissima in vitro* BULBS

### Abstract

In micropropagation of geophyte species as *Sprekelia formosissima*, the formation of bulbs is sought, which grow and accumulate carbohydrates depending on the P and sucrose levels in the medium. The aim of the assay was to study *in vitro* the accumulation of soluble sugars and starch and the activity of AGPase, SSS and GBSS in *S. formosissima* bulbs under different concentrations of sucrose (3, 5, 7, and 9%) and (0.62, 1.25 and 1.87 mmol). The bulblets were incubated for 12 weeks in the dark in MS medium with 2 mg L<sup>-1</sup> of BA. In bulbs, the concentration of starch, fructose, sucrose, total soluble sugars (AST) and reducing sugars, enzymatic activity (EA) and specific enzyme activity (ESA) of AGPase, SSS and GBSS, fresh weight and diameter were recorded, leaves and roots were counted with average length and fresh weight. With these data, an ANOVA and Tukey test were performed (p<0.05). AST, sucrose and fructose increased with 9 % sucrose (15.86, 8.49 and 2.84 mg/g fresh weight, respectively) and starch with 7 and 9 % (25.88 and 27.23 mg/g fresh weight, respectively). AE and AEE of AGPase increased with 5% sucrose and 1.25 mmol P. SSS and GBSS AE and AEE increased with 9% sucrose and 0.62 and 1.25 mmol of P and with 7% sucrose and 0.62 mmol of P, respectively. The AE and AEE of all three enzymes increased with 7% sucrose. Increasing P from 1.25 to 1.87 mmol decreased AGPase AE and AEE. Sucrose affects nonstructural carbohydrate accumulation and AGPase, SSS and GBSS activity in *S. formosissima in vitro* bulbs.

Keywords: Carbon metabolism in geophytes, sucrose, nonstructural carbohydrates.

## Introducción

La formación de los órganos de reserva es un proceso clave y distintivo en la micropropagación de plantas bulbosas, mediante esta técnica se pueden producir un gran número de plantas de calidad alta en un tiempo corto (Wu *et al.*, 2021). En algunas plantas geófitas ornamentales como lili, la micropropagación comercial ya se hace de forma exitosa, otras flores bulbosas como tulipán e iris inicialmente forman sólo brotes *in vitro* que tienen que pasar por un proceso de bulbificación para asegurar una transferencia *ex vitro* exitosa (Askari *et al.*, 2018; De Klerk, 2012).

Las investigaciones en la micropropagación de *Sprekelia formosissima* se han centrado en la optimización de las condiciones de cultivo para inducir la formación y crecimiento de los bulbos *in vitro*, entre ellas la composición del medio de cultivo basal, el balance en los reguladores de crecimiento y la concentración de sacarosa (Cázarez *et al.*, 2010) que es el carbohidrato más utilizado en el cultivo de tejidos (Sumaryono *et al.*, 2012) y sirve como fuente de carbono y puede afectar funciones fisiológicas durante el crecimiento y desarrollo de las plantas (Gao *et al.*, 2018).

El crecimiento del bulbo es un proceso caracterizado por la acumulación gradual de almidón, el cual puede ser utilizado como reserva de nutrientes en etapas de crecimiento posteriores al llenado del bulbo (Li *et al.*, 2014) como la brotación y formación de flores. La sacarosa es el donador glucosídico para la biosíntesis de almidón en los órganos demanda, donde se descarga desde el floema a donde llega vía los complejos que forman los elementos de tubo criboso y las células acompañantes (Wu *et al.*, 2021). La síntesis de almidón requiere de la actividad de varias enzimas incluidas la adenosin 5´difosfato glucosa pirofosforilasa (AGPasa), almidón sintasa (SSS), almidón sintasa ligada al granulo de almidón (GBSS) y la enzima ramificadora de almidón (GBE) (Smith y Zeeman, 2020). La actividad de estas enzimas y la acumulación de carbohidratos no estructurales en los bulbos de *Sprekelia formosissima* (almidón y otros azúcares solubles) pueden verse afectados por la concentración de sacarosa en el medio de cultivo y reflejarse en el incremento de biomasa y tamaño de los bulbos producidos *in vitro*.

En la síntesis y catabolismo de carbohidratos, el fósforo utilizado como ortofosfato (Pi) (Dissanayaka *et al.*, 2021), controla la función de muchas proteínas vía su afinidad covalente a las fosfoproteínas y/o actuando como un inhibidor o activador alostérico (Plaxton y Shane, 2015) de enzimas clave en el metabolismo del carbono en las plantas (Vance *et al.*, 2003). Además, el fósforo tiene un papel central en la transferencia de energía y forma parte estructural de biomoléculas como azúcares fosfato, fosfolípidos, ácidos nucleicos y adenilatos (Lambers y Plaxton, 2015).

La acumulación de carbohidratos no estructurales y la actividad de las enzimas relacionadas con su síntesis en los órganos de reserva de *S. formosissima* son aspectos que deben estudiarse para el diseño de un protocolo eficiente de propagación *in vitro*. Sin embargo, en la micropropagación de *S. formosissima* se han probado diferentes concentraciones de BA/IBA y sacarosa (1, 2, 3, 4 y 5 %) en el medio de cultivo (Cázarez *et al.*, 2010) con resultados limitados a medir variables de crecimiento del bulbo sin estudiar el efecto de la concentración de sacarosa sobre el metabolismo del carbono. Además, el mayor crecimiento del bulbo se reportó con 5 % de sacarosa sin comparar el efecto de concentraciones más altas ya que no se probaron. Por lo anterior, el objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la concentración alta de sacarosa y P en el medio de cultivo sobre el crecimiento y la dinámica del carbono en bulbos de *Sprekelia formosissima* propagados *in vitro*.

## **Materiales y métodos**

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en Uruapan, Michoacán.

### **Tratamientos para evaluar el efecto de la sacarosa y fósforo**

El material vegetal utilizado (bulbos de *S. formosissima*) fue propagado *in vitro* a partir de semilla como se describió en el capítulo I en el que se probaron diferentes intensidades de luz.

El experimento se realizó con arreglo de tratamientos factorial donde los factores a evaluar fueron concentración de sacarosa y fósforo en el medio de cultivo, sobre el crecimiento y metabolismo del carbono en bulbos de *Sprekelia formosissima* (Cuadro 3). La disposición de las unidades experimentales se realizó bajo un diseño en bloques al azar con 10 repeticiones, la unidad experimental consistió en dos bulbillos en un frasco con 25 mL de medio de cultivo MS modificado de acuerdo con los tratamientos. Las unidades experimentales fueron dispuestas en bloques de acuerdo con el peso de los bulbos (0.6 a 1.7 g).

**Cuadro 3.** Tratamientos para evaluar el efecto de la sacarosa y fósforo sobre el metabolismo del carbono y crecimiento de bulbos de *S. formosissima* cultivados *in vitro*.

Tratamiento	Sacarosa (%)	Fósforo (mmol)
1	3	0.62
2	3	1.25
3	3	1.87
4	5	0.62
5	5	1.25
6	5	1.87
7	7	0.62
8	7	1.25
9	7	1.87
10	9	0.62
11	9	1.25
12	9	1.87

### VARIABLES EVALUADAS

Se evaluó la posible relación de los factores estudiados con la concentración de carbohidratos (almidón, fructosa, sacarosa, azúcares solubles totales y reductores), actividad enzimática y actividad enzimática específica de las enzimas AGPasa, GBSS y SSS en bulbos, así como el peso fresco y diámetro de bulbos. También se midió el número, longitud promedio y peso fresco de hojas y raíces. La evaluación de variables se realizó después de 12 semanas de incubación de los bulbos en oscuridad a 25 °C.

La determinación de almidón y azúcares solubles (fructosa, sacarosa, azúcares solubles totales y reductores) se realizó como se describió en el capítulo I. La actividad enzimática se determinó con el método utilizado por Wu *et al.* (2016) que fue modificado. Para la extracción de las enzimas se utilizaron alrededor de 50 mg de tejido pulverizado de bulbo congelado en nitrógeno líquido y 1 mL de medio extracción con 100 mmol L<sup>-1</sup> HEPES-NaOH (pH 7.6), 8 mmol L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>, 5 mmol L<sup>-1</sup> ditionitrietol (DTT), 2 mmol L<sup>-1</sup> de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 50 mmol L<sup>-1</sup> de 2-mercaptoetanol, glicerol (12.5 % v/v) y 5 % (0.05 g mL<sup>-1</sup>) de polivinilpirrolidona-40, la mezcla se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para determinar AGPasa (EC 2.7.7.27) y SSS (EC 2.4.1.21) y el sedimento para GBSS (2.4.1.21).

El análisis de AGPasa se realizó con 20 µL del sobrenadante obtenido en el paso anterior y 120 µL de una mezcla de 100 mmol L<sup>-1</sup> de HEPES-NaOH (pH 7.4), 1.2 mmol L<sup>-1</sup> de ADP-glucosa, 3 mol L<sup>-1</sup> de ácido fosfórico inorgánico (PPi), 5 mmol L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>, 4 mmol L<sup>-1</sup> de ditionitrietol (DTT), la mezcla se incubó a 30 °C por 20 minutos, luego la reacción se detuvo por calentamiento en agua hirviendo durante 1 minuto para luego centrifugarse a 14,000 rpm por 15 minutos. Se tomó una porción del sobrenadante (33.4 µL) y se mezcló con 13.8 µL de NADP (mM), 1.4 µL de fosfoglucomutasa (0.4 U) y 1.4 µL de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (0.4 U).

El análisis de la enzima SSS se realizó con 25 µL de sobrenadante al que se adicionaron 45 µL de la mezcla de reacción con 50 mmol L<sup>-1</sup> de HEPES-NaOH (pH 7.4), 1.2 mmol L<sup>-1</sup> de ADP-glucosa, 0.7 mg de amilopectina y 15 mmol L<sup>-1</sup> de DTT. La reacción se incubó por 20 minutos a 30 °C y luego se colocó por 1 minuto en agua hirviendo para después enfriar rápidamente en hielo. Después se agregaron 25 µL de una solución de 50 mmol L<sup>-1</sup> de HEPES-NaOH (pH 7.4), 5 mmol L<sup>-1</sup> de fosfoenolpiruvato (PEP), 200 mmol L<sup>-1</sup> de KCl, 10 mmol L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub> y piruvato quinasa (1.2 U) para incubarse por 30 minutos a 30 °C en baño de agua. La solución resultante se calentó en agua hirviendo por un minuto, se dejó enfriar y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante (28 µL) se mezcló con 19.4 µL de la mezcla con 50 mmol L<sup>-1</sup> de HEPES-NaOH (pH 7.4), 10 mmol L<sup>-1</sup> de glucosa, 20 mmol L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol L<sup>-1</sup> de NADP, 1 µL de hexoquinasa (2.8 U) y 1.6 µL de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P deshidrogenasa, 0.35 U). Para el análisis de

la enzima GBSS el sedimento se lavó dos veces con 1 mL de la solución buffer de extracción ya descrita y se detectó con el mismo método usado para la enzima SSS.

Para estimar la actividad de las tres enzimas se midió la absorbancia a 340 nm por diez minutos cada 15 segundos. Con el programa Excel® se graficó la respuesta obtenida en cada muestra y se calculó la pendiente de la línea a partir de los 180 y hasta los 480 segundos. Con la pendiente y el tiempo de la reacción en minutos, se calculó el delta de absorbancia, luego se obtuvo la actividad enzimática con el coeficiente de extinción molar del NADPH ( $6620 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y el peso de cada muestra. La actividad enzimática específica se calculó con base en la cantidad de proteína total determinada con el método de Bradford (1976).

### **Análisis estadístico**

Con los datos registrados se realizaron las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilks o Kolmogorov-Smirnov y la prueba de homogeneidad de varianzas entre tratamientos de Levene. Los datos de las variables que no cumplieron con estos supuestos (número, longitud promedio y peso fresco de hojas, peso fresco y diámetro de bulbo y peso fresco de raíces no mostraron normalidad.) fueron transformados. Los datos de número de hojas no se normalizaron con ninguna transformación probada, la longitud promedio de hojas se transformó con  $\log [z + \sqrt{(z^2 + 1)}]$ , el peso fresco de hojas, raíces y bulbos con  $\log [1/z + \sqrt{(1/z^2 + 1)}]$  y el diámetro de bulbo con  $\sqrt{(z^2 + 1)}$ .

Los datos de actividad enzimática y actividad enzimática específica de SSS y GBSS no mostraron normalidad en su distribución ni homogeneidad de varianzas. Los registros de estas variables se transformaron con  $\log (z + 1)$ , para normalizarlos.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y la prueba de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Cada una de las etapas del análisis estadístico se realizó con el programa SAS OnDemands for Academics® (SAS, 2023).

## Resultados y discusión

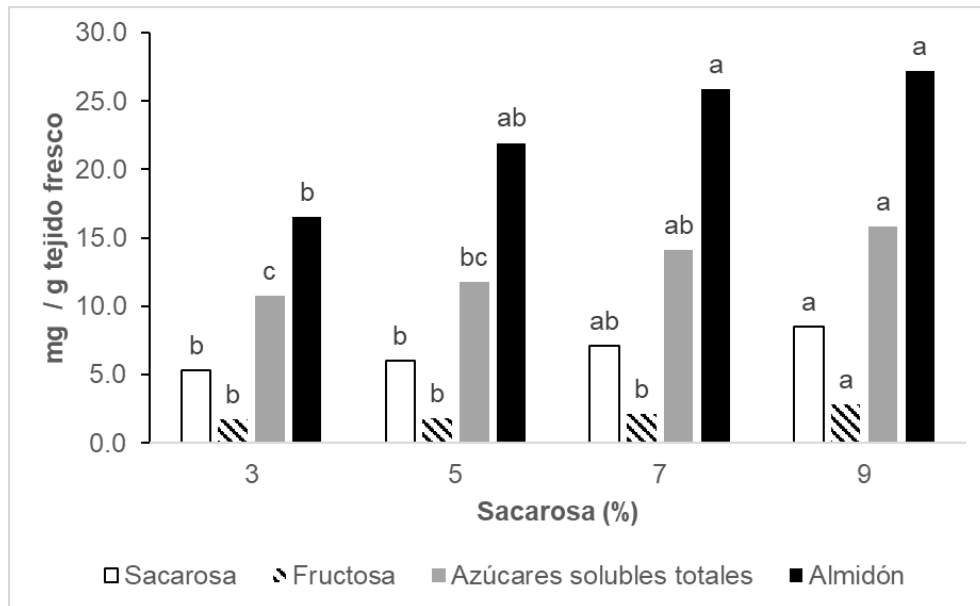
La concentración de sacarosa en el medio de cultivo afectó de forma significativa el contenido de almidón, azúcares solubles totales, fructosa y sacarosa en los bulbos de *S. formosissima* propagados *in vitro*. La concentración de fósforo y su interacción con la sacarosa no influyó en la concentración de estos carbohidratos (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto de sacarosa y fósforo sobre la concentración de carbohidratos no estructurales en bulbos de *S. formosissima* propagados *in vitro*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Sacarosa	Fructosa	Azúcares solubles totales	Azúcares reductores	Almidón
Sacarosa	3	22.75**	3.06**	63.24**	0.41 <sup>NS</sup>	193.75*
Fósforo (P)	2	1.15 <sup>NS</sup>	0.04 <sup>NS</sup>	0.11 <sup>NS</sup>	0.22 <sup>NS</sup>	0.76 <sup>NS</sup>
Interacción						
Sacarosa*P	6	0.67 <sup>NS</sup>	0.07 <sup>NS</sup>	3.41 <sup>NS</sup>	0.49 <sup>NS</sup>	0.89 <sup>NS</sup>
Bloque	3	9.26*	0.84 <sup>NS</sup>	26.54*	2.53**	0.002**
C.V.		24.42	26.24	19.21	20.78	31.03
R <sup>2</sup>		0.53	0.54	0.57	0.45	0.58

CV = coeficiente de variación, R<sup>2</sup> = coeficiente de determinación, NS = diferencia no significativa, \* y \*\* = diferencias significativas a  $P \leq 0.05$  y  $P \leq 0.01$ , respectivamente.

La concentración de azúcares solubles totales y almidón se incrementó en los bulbos cultivados en medio con 7 y 9 % de sacarosa en el medio de cultivo (14.12 y 25.88 y 15.86 y 27.23 mg / g peso fresco, respectivamente), en comparación con los bulbos cultivados en medio con 3 % de sacarosa (10.78 y 16.53 mg / g peso fresco, respectivamente). La concentración de sacarosa y fructosa aumentó 65 y 59 %, respectivamente en los bulbos cultivados con 9 % de sacarosa en el medio de cultivo, comparada con los bulbos incubados con 3 % de sacarosa, en los que se midió una concentración de estos carbohidratos, estadísticamente igual a la registrada con 5 y 7 % de este disacárido en el medio (Figura 5).



**Figura 5.** Concentración de carbohidratos no estructurales en bulbos de *S. formosissima* por efecto de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo. Medias con las mismas letras sobre el mismo tipo de barra, no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ).

La acumulación de carbohidratos no estructurales en los bulbos *S. formosissima* muestran que incrementar la concentración de sacarosa en el medio de cultivo puede ser un elemento importante de la estrategia para obtener bulbos que muestren un mayor vigor en la brotación *ex vitro*, ya que los carbohidratos sirven como fuente de energía para el funcionamiento celular en las plantas geófitas y están involucrados en casi todo el ciclo de vida, desde la latencia hasta el crecimiento. Estos carbohidratos incluyen a azúcares solubles como glucosa, fructosa y sacarosa y azúcares no solubles como el almidón, que pueden ser transformados en cada una de estas formas a través del metabolismo. Todos los carbohidratos pueden proveer de energía a las plantas (ATP y NADPH) a través de la glicólisis (Zhao *et al.*, 2022). Además, la acumulación de grandes cantidades de carbohidratos en los órganos de almacenamiento en las geófitas asegura una fuente de carbono y suministro de energía durante condiciones no favorables, lo que permite una brotación y crecimiento reproductivo rápidos en condiciones ambientales favorables (Ranwala y Miller, 2008).

Al igual que en este experimento, en un estudio para determinar el contenido de carbohidratos no estructurales en los órganos de reserva de 30 plantas geófitas, se registró la presencia de azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa en concentraciones menores a 100 mg g<sup>-1</sup> peso seco), con concentraciones de sacarosa mayores a las de glucosa y fructosa en las 30 especies (Ranwala y Miller, 2008).

El mayor contenido de almidón en los bulbos de *S. formosissima* cultivados *in vitro* se registró con 9 % de sacarosa en el medio de cultivo. Algunos reportes indican que la formación de almidón es un parámetro importante para identificar la iniciación y crecimiento de los órganos de reserva (Fernie y Willmitzer, 2001) y que es un proceso simultáneo con el incremento del tamaño de estos órganos (Kloosterman *et al.*, 2008; Firon *et al.*, 2013).

En los bulbos de *S. formosissima* el incremento del contenido de almidón no coincidió con el aumento del tamaño estos órganos, ya que todos los bulbos perdieron, en promedio, 36 % de su peso inicial, lo que muestra que además de ser órganos demanda, los bulbos pueden desempeñar un papel como órgano fuente (cuando el almidón se hidroliza en glucosa para la obtención de energía) (Wei *et al.*, 2024), ya que en condiciones de oscuridad, los bulbos formaron hojas y raíces, lo que demandó el consumo de carbohidratos, para el crecimiento vegetativo y provocó una pérdida de biomasa en estos órganos, sin mostrar un efecto claro de la concentración de sacarosa en el medio del cultivo sobre su tamaño.

Aunque los bulbos de todos los tratamientos perdieron peso durante las 12 semanas de cultivo, la interacción de la concentración de sacarosa y P tuvo efecto sobre el peso fresco final y diámetro de los bulbos (Cuadro 5) que se incrementaron con 3 % de sacarosa y 0.62 y mmol de P y 5 % de sacarosa y 1.25 mmol de P, en contraste el tratamiento con 7 % de sacarosa y 0.62 mmol de P produjo los bulbos más pequeños (Cuadro 6). No hubo efecto significativo por la concentración de sacarosa o fósforo ni su interacción para el número, longitud promedio y peso fresco de hojas y raíces (Cuadro 5) que en promedio fue de 1.42, 4.57 cm y 0.176 g y 1.77, 3.77 cm y 0.049 g, respectivamente.

**Cuadro 5.** Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto de la concentración de sacarosa y fósforo sobre el crecimiento de *S. fomorsissima* propagada *in vitro*.

Fuente de variación	GL	LPH	PFH	PFB	DB	NR	LR	PFR
Sacarosa	3	0.20 <sup>NS</sup>	0.32 <sup>NS</sup>	0.091 <sup>NS</sup>	0.04 <sup>NS</sup>	0.90 <sup>NS</sup>	2.46 <sup>NS</sup>	0.07 <sup>NS</sup>
Fósforo (P)	2	0.90 <sup>NS</sup>	0.76 <sup>NS</sup>	0.007 <sup>NS</sup>	0.02 <sup>NS</sup>	0.38 <sup>NS</sup>	0.29 <sup>NS</sup>	0.08 <sup>NS</sup>
Interacción Sacarosa*P	6	0.15 <sup>NS</sup>	0.25 <sup>NS</sup>	0.277*	0.09*	0.30 <sup>NS</sup>	2.57 <sup>NS</sup>	0.86 <sup>NS</sup>
Bloque	4	0.40 <sup>NS</sup>	2.70**	2.642**	0.86**	1.21 <sup>NS</sup>	4.66 <sup>NS</sup>	3.09**
R <sup>2</sup>		0.25	0.42	0.73	0.74	0.30	0.35	0.44
CV		28.86	25.23	15.38	6.97	41.48	35.96	18.27

CV = coeficiente de variación, GL = Grados de libertad, R<sup>2</sup> = coeficiente de determinación, NS = diferencia no significativa, \* y \*\* = diferencias significativas a P ≤ 0.05 y P ≤ 0.01, respectivamente. LPH = Longitud promedio de hojas; PFH = Peso fresco de hojas; PFB = Peso fresco de bulbos; DB = diámetro de bulbo; NR = número de raíces, LR = longitud de raíces y PFR = peso fresco de raíces. Los datos de las variables LPH [ $\log \{z + \sqrt{(z^2+1)}\}$ ], PFH, PFB, PFR [ $\log \{1/z + \sqrt{(1/z^2 + 1)}\}$ ] y DB ( $z^2+1$ ) se transformaron para realizar el análisis de varianza.

**Cuadro 6.** Efecto de la concentración de sacarosa y P en el medio de cultivo sobre peso fresco y diámetro de bulbo en *S. formosissima* propagada *in vitro*.

Tratamiento	Sacarosa (%)	P (mmol)	Peso fresco de bulbo (g)	Diámetro de bulbo (mm)
1	3	0.62	0.257 ab	5.84 ab
2	3	1.25	0.404 a	6.70 a
3	3	1.87	0.264 ab	5.98 ab
4	5	0.62	0.412 a	7.00 a
5	5	1.25	0.286 ab	5.66 ab
6	5	1.87	0.268 ab	5.90 ab
7	7	0.62	0.226 b	4.70 b
8	7	1.25	0.282 ab	6.12 ab
9	7	1.87	0.364 ab	6.42 ab
10	9	0.62	0.274 ab	5.64 ab
11	9	1.25	0.244 ab	5.64 ab
12	9	1.87	0.359 ab	6.10 ab

Medias con letras iguales en columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) para diámetro de bulbo con una DSH = 0.4 y Duncan para peso fresco de bulbos.

La actividad enzimática y la actividad enzimática específica de AGPasa, SSS y GBSS en los bulbos de *S. formosissima* cultivados *in vitro* fueron modificadas de forma significativa por efecto de la interacción de la concentración de sacarosa y fósforo en el medio cultivo. La concentración de sacarosa tuvo efecto sobre la actividad de estas enzimas, excepto para la AEE de GBSS. Además, el P influyó sobre la AE y la AEE de la AGPasa (Cuadro 7).

La actividad enzimática y la actividad enzimática específica de la AGPasa en los bulbos cultivados *in vitro* se incrementaron 120 y 60 veces más, con el tratamiento con 5 % de sacarosa y 1.25 mmol de P en el medio de cultivo, comparadas con la AE y la AEE de los bulbos en 3 % de sacarosa y 1.87 mmol de P, que registraron los valores más bajos (Figura 6A). La enzima AGPasa está distribuida frecuentemente en los órganos fotosintéticos, de transporte y almacenamiento de las plantas (Kumari *et al.*, 2014) y cataliza la reacción para la

obtención de ADP-glucosa a partir de glucosa 1-fosfato y ATP, por lo que, con estos niveles de sacarosa y P se espera un incremento en la concentración de esta molécula, que sirve como sustrato de las enzimas GBSS y SSS para la síntesis de almidón.

**Cuadro 7.** Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto de la concentración de sacarosa y P sobre la actividad de las enzimas AGPasa, SSS y GBSS en bulbos de *S. formosissima* propagados *in vitro*.

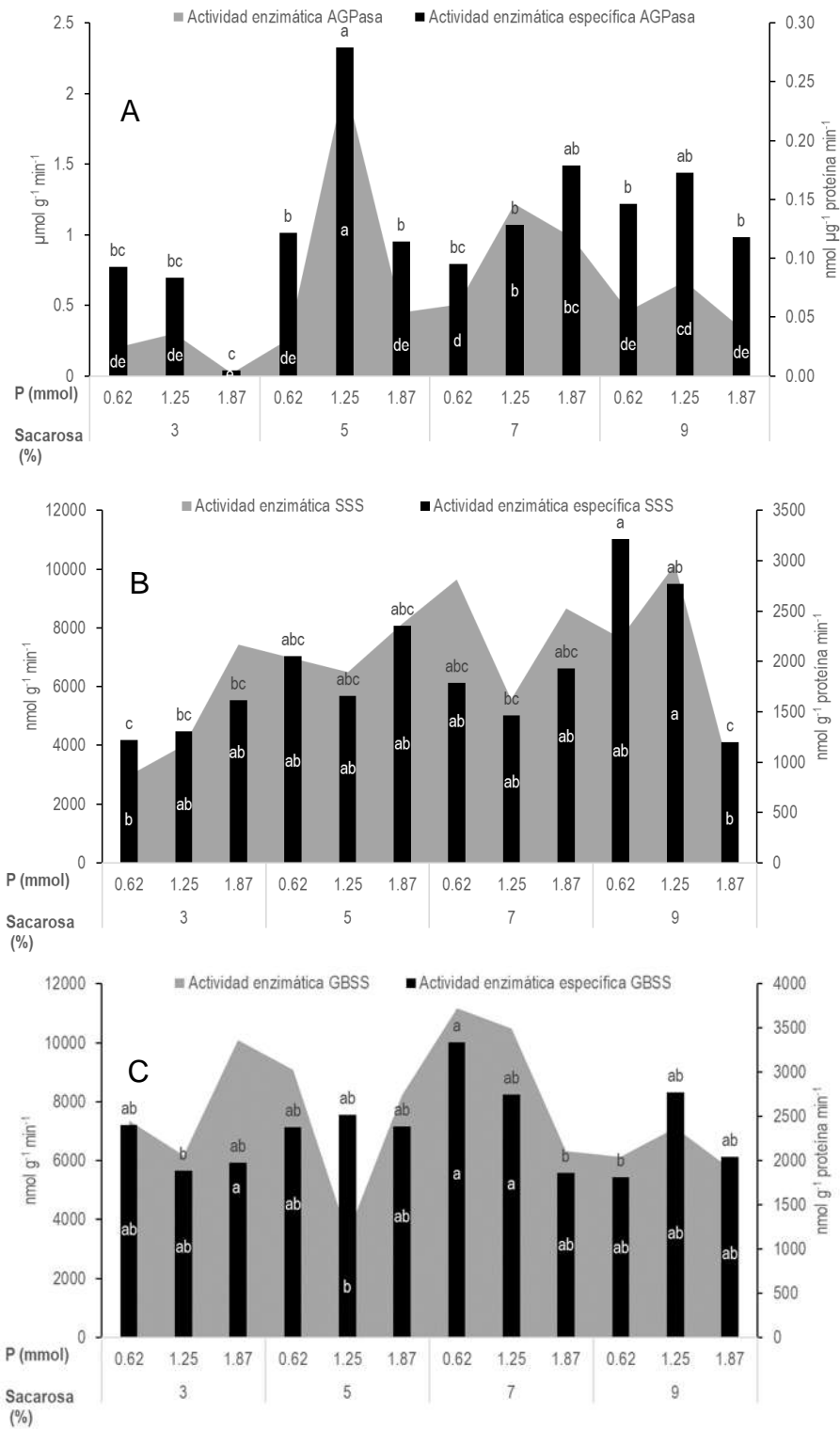
Factor de variación	Grados de libertad	Actividad enzimática			Actividad enzimática específica		
		AGPasa	SSS	GBSS	AGPasa	SSS	GBSS
Sacarosa	3	0.424**	0.497*	0.707**	0.009**	0.401*	0.137 <sup>NS</sup>
Fósforo (P)	2	1.176**	0.169 <sup>NS</sup>	0.126 <sup>NS</sup>	0.010**	0.249 <sup>NS</sup>	0.068 <sup>NS</sup>
Interacción							
Sacarosa*P	6	0.401**	0.720**	0.585**	0.006**	0.351**	0.172*
Bloque	3	0.048**	1.438**	4.140 <sup>NS</sup>	0.002**	0.506 <sup>NS</sup>	1.164**
C.V.		24.64	4.70	3.30	26.25	4.14	3.11
R <sup>2</sup>		0.94	0.66	0.78	0.83	0.62	0.66

CV = coeficiente de variación, R<sup>2</sup> = coeficiente de determinación, NS = diferencia no significativa, \* y \*\* = diferencias significativas a P ≤ 0.05 y P ≤ 0.01, respectivamente. Los datos de actividad enzimática y actividad enzimática específica de SSS y GBSS [log (z+1)] se transformaron para realizar el análisis de varianza.

La actividad enzimática de AGPasa ha sido reportada en otras plantas geófitas como en estolones de *Tulipa edulis* donde se registraron valores de actividad enzimática de 0.5 a poco más de 5  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$  (Miao *et al.*, 2016) similares a la actividad enzimática encontrada en los bulbos de *S. formosissima* en este experimento, aunque en bulbos de lilis se registraron valores de actividad enzimática específica de la AGPasa de 8 a 29  $\text{nmol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$  (Wu *et al.*, 2016) que son altos en comparación con los valores encontrados en este trabajo (Figura 6A) lo que permite una mayor síntesis y acumulación de almidón y explica porque el desarrollo de los bulbos de lilis es más rápido que en *Sprekelia*.

La actividad de SSS y GBSS registraron datos más altos (AE de 2,969.76 a 10,167 y 3,483.39 a 11,169  $\text{nmol g}^{-1} \text{min}^{-1}$  y AEE de 1,200.91 a 3,213.83 y 1,807.84 a 3,336.87  $\text{nmol g}^{-1} \text{proteína}^{-1} \text{min}^{-1}$ , respectivamente) en comparación con AGPasa (AE de 0.017 a 2.07  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$  y AEE de 0.0047 a 0.2792  $\text{nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$ ) (Figura 6), un comportamiento similar al que se reporta para *T. edulis* y *lilis* (Miao *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016). Las actividades de SSS y GBSS son los principales factores que afectan la acumulación de nutrientes en los bulbos, aunque durante un mismo periodo la actividad de AGPasa puede ser significativamente superior a la de las otras enzimas (Wei *et al.*, 2024), lo que comprueba que el mecanismo de acumulación de azúcar y la regulación de las enzimas metabólicas varía entre las diferentes especies (Wu *et al.*, 2021).

La actividad enzimática y actividad enzimática específica de la SSS fueron más altas con 9 % de sacarosa y 0.62 y 1.25 mmol de P, respectivamente (Figura 6B). En cambio, la actividad enzimática y actividad enzimática específica más altas de GBSS, se observaron con 7 % de sacarosa y 0.62 mmol de P que se incrementaron en 220 y 77 %, en comparación con los valores más bajos, registrados con 1.25 mmol de P y 5 y 3 % de sacarosa, respectivamente. Con este mismo porcentaje de sacarosa y 1.25 mmol de P y la combinación de 3 % de sacarosa y 1.87 mmol de P la actividad enzimática específica de GBSS fueron estadísticamente iguales que el tratamiento con registro más alto (Figura 6C). En *Lycoris erythra* la actividad de SSS fue mayor que la de GBSS en diferentes etapas de desarrollo, lo que muestra que el metabolismo del almidón en bulbos está dominado por la amilopeptina (Wei *et al.*, 2024) ya que la GBSS está implicada en la síntesis de amilosa, que representa sólo entre 10 y 30 % del almidón, mientras la SSS participa de la síntesis de la amilopeptina que puede llegar a constituir el 70 % del polisacárido, por lo que responde a incrementos mayores en la concentración de sacarosa, como en este ensayo donde mostró la mayor actividad con 9 % sacarosa.

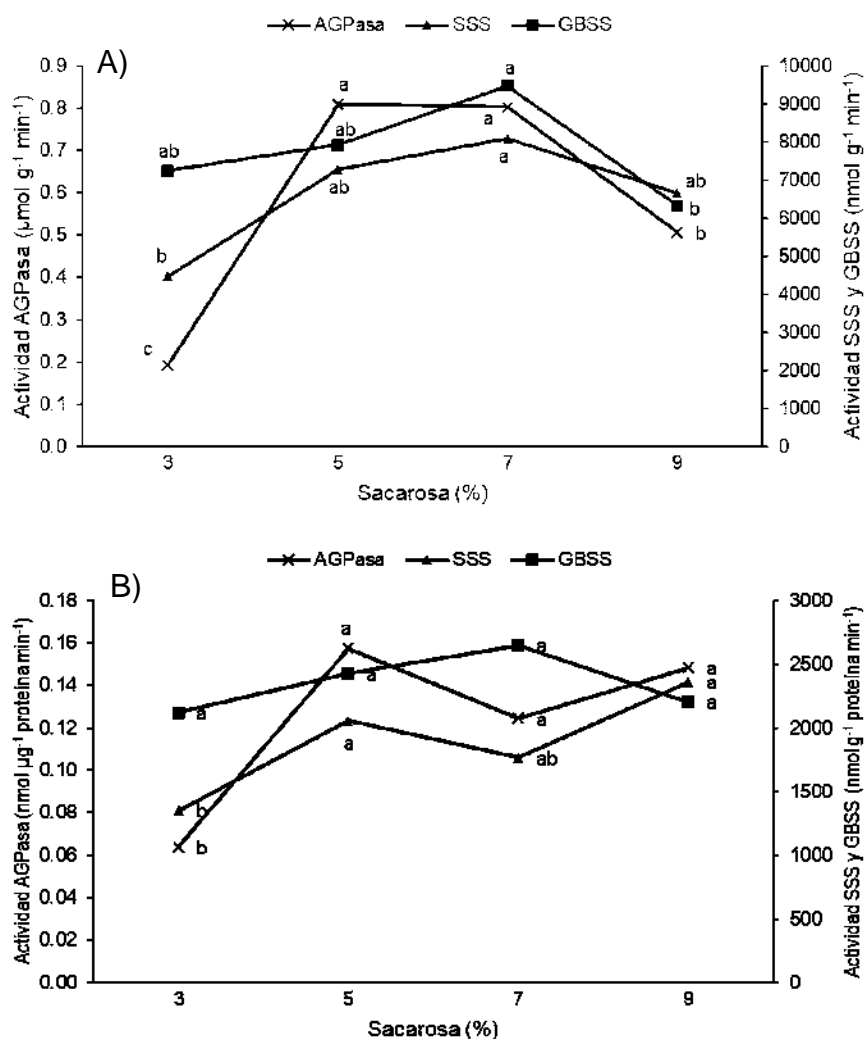


**Figura 6.** Actividad enzimática y actividad enzimática específica de A) AGPasa, B) SSS y C) GBSS en bulbos de *S. formosissima* propagados *in vitro* bajo diferentes concentraciones de sacarosa y fósforo en el medio de cultivo. Medias con la misma letra sobre las barras o vértices del área sombreada no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ).

Estos resultados corroboran que el contenido de carbohidratos no estructurales y la actividad de las enzimas relacionadas con la síntesis de almidón se ven fácilmente afectados por las condiciones externas y por las propias condiciones metabólicas y de crecimiento de las especies geófitas cultivadas (Wei *et al.*, 2024) y contribuyen al conocimiento sobre la dinámica del carbono en bulbos de *S. formosissima* que permitirá diseñar estrategias para incrementar el tamaño y acumulación de carbohidratos en los bulbos, que se utilizan para la propagación vegetativa de esta especie.

Al igual que el contenido de almidón, las enzimas relacionadas con la síntesis de almidón también mostraron un aumento en su actividad con concentraciones de sacarosa altas. La actividad de las tres enzimas (AGPasa, SSS y GBSS) se incrementó con 7 % de sacarosa en el medio de cultivo: AGPasa ( $0.802 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ ), SSS ( $9,466.18 \text{ nmol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) y GBSS ( $8,080.04 \text{ nmol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ ). La actividad de AGPasa y SSS disminuyó en 76.05 y 52.68 %, respectivamente, en tejido de bulbos que se incubaron con la concentración de sacarosa del tratamiento testigo (3 %). Solo para GBSS, la actividad enzimática fue 21.72 % menor con la mayor concentración de sacarosa probada (9 %) (Figura 7A). La actividad enzimática específica de AGPasa y SSS fue mayor con el incremento de sacarosa en el medio de cultivo y estadísticamente igual con 5, 7 y 9 % de este disacárido. Con 3 % de sacarosa, la actividad específica de AGPasa y GBSS fue menor en 42.8 y 59.6 % con respecto a los valores más altos registrados. La actividad enzimática específica de GBSS no mostró diferencia estadística significativa por efecto de la sacarosa (Figura 7B).

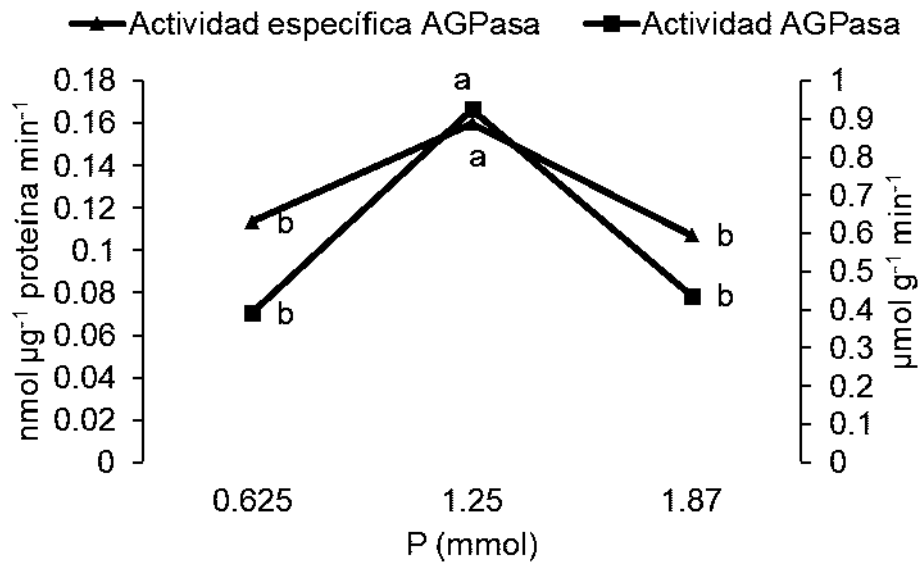
La actividad de las principales enzimas involucradas en la síntesis de almidón usualmente está correlacionada positivamente con la acumulación de almidón en los órganos demanda (Li *et al.*, 2022). En bulbos de jacinto recién formados *in vivo* también se registró una actividad alta de AGPasa y SSS con la acumulación de almidón en estos órganos (Addai, 2011) y en *Lycoris radiata*, los cambios en el contenido de almidón se correlacionaron positivamente con el contenido de sacarosa y la actividad de enzimas clave en el metabolismo de carbohidratos no estructurales, entre ellas AGP y SSS (Wei *et al.*, 2024).



**Figura 7.** Efecto de la concentración de sacarosa sobre la A) actividad enzimática y B) actividad enzimática específica de AGPasa, SSS y GBSS en bulbos de *S. formosissima* propagados *in vitro*. Medias con la misma letra sobre la misma línea no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ).

La actividad de AGPasa se incrementó 135.6 y 40.7 % (para actividad enzimática y actividad enzimática específica, respectivamente) cuando la concentración de P pasó de 0.625 a 1.25 mmol. El incremento en la concentración de P hasta 1.87 mmol disminuyó la actividad de AGPasa a niveles similares a los registrados con 0.625 mmol (Figura 8). Estos resultados coinciden con los reportes que mencionan que la AGPasa, la primera enzima en la ruta para la síntesis de almidón es estimulada por el ácido 3-fosfoglicérico e inhibida por el fosfato inorgánico (Pi) (Qu *et al.*, 2018). La concentración de P alta en el medio de cultivo

también tuvo un efecto inhibitorio en la actividad enzimática y actividad enzimática específica de SSS que mostraron los valores más altos con 9 % de sacarosa y 0.62 y 1.25 mmol de P, respectivamente y los valores más bajos con la misma concentración de sacarosa, pero con el nivel de P mayor (1.87 mmol) (Figura 6B).



**Figura 8.** Efecto de la concentración de fósforo sobre la actividad enzimática y actividad enzimática específica de AGPasa en bulbos de *S. formosissima* propagados *in vitro*. Medias con la misma letra sobre la misma línea no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ).

### Conclusiones

La adición de sacarosa y P al medio de cultivo puede usarse para la obtención de bulbos de *S. formosissima* con un mayor contenido de carbohidratos no estructurales que les permitan obtener energía durante la brotación, ya que estos factores provocan cambios en la concentración de estos carbohidratos y la actividad de las enzimas implicadas en la síntesis de almidón en los bulbos *in vitro*. La concentración de azúcares solubles totales, sacarosa y almidón se incrementa con 5, 7 y 9 % de sacarosa, la fructosa solo se incrementa con 9 % de este carbohidrato. La actividad enzimática y actividad enzimática específica de AGPasa, SSS y GBSS aumentan con 7 % de sacarosa y para AGPasa y SSS disminuye con el incremento en la concentración de P (1.25 mmol).

## Literatura citada

- Addai I. K. and P. Scott (2011) Regulation of carbohydrates partitioning and metabolism of the common hyacinth. *Agriculture and Biology Journal of North America* 2(2): 279-297.
- Askari N., Visser R. G. F. and G. J. De Klerk (2018) Growth of lily bulblets *in vitro*, *Review International Journal of Horticultural Science and Technology* 5(2): 133-143.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Cázarez P. M. R. M. Andrade, M. A. Villegas, T. I. Alia, T. O. G. Villegas and M. V. López (2010) *In vitro* propagation of *Sprekelia formosissima* Herbert, a wild plant with ornamental potential. *Revista Fitotecnia Mexicana* 3(33):197-203.
- De Klerk G. J. (2012) Micropropagation of bulbous crops: Technology and present state. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 6 (Special issue):1-8.
- Dissanayaka D. M. S. B., M. Ghahremani, M. Siebers, J. Wasaki and W. C. Plaxton (2021) Recent insights into the metabolic adaptations of phosphorus-deprived plants. *Journal of Experimental Botany* 72(2):199-223.
- Fernie A. R. and L. Willmitzer L (2001) Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiology* 127:1459-1465.
- Firon N., D. LaBonte, A. Villordon, Y. Kfir, J. Solis, E. Lapis, T. S. Perlman, A. Doron-Faigenboim, A. Hetzroni, L. Althan, L. A. Nadir (2013) Transcriptional profiling of sweet potato (*Ipomoea batatas*) roots indicates down-regulation of lignin biosynthesis and up-regulation of starch biosynthesis at an early stage of storage root formation. *BMC Genomics* 14:46.
- Gao S., Y. Zhu, L. Zhou, X. Fu, T. Lei, Q. Chen, X. Yu, Y. Zhou, W. Li, J. Hu, D. Hu and W. Si (2018) Sucrose signaling function on the formation and swelling of bulblets of *Lilium sargentiae* E.H. Wilson. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 135:143-153. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1451-4>
- Kloosterman B., D. De Koeyer, R. Griffiths, B. Flinn, B. Steuernagel, U. Scholz, S. Sonnewald, U Sonnewald, G. J. Bryan, S. Prat, Z. Bánfalvi, J. P. Hammond, P. Geigenberger, K. L. Nielsen, R. G. F. Visser, C. W. B. Bachem (2008) Genes driving potato tuber initiation and growth: identification based on

- transcriptional changes using the POCI array. *Functional and Integrative Genomic* 8: 329–340.
- Kumari, A., V. Paul, R. Pandey and M. C. Ghildiyal (2014) Soluble starch synthase activity in relation to thermal tolerance of developing wheat (*Triticum aestivum*, *Triticum durum*) and maize (*Zea mays*) grains. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 84(7):839-843. <https://doi.org/10.13140/2.1.4900.9285>
- Lambers H. and W. C. Plaxton (2015) Phosphorus: back to the roots. *In: Plaxton W.C. and H. Lambers (eds.) Annual Plant Reviews. Phosphorus metabolism in plants.* Hoboken: Wiley-Blackwell (48):1–22.
- Li X. Y., C. X. Wang, J. Y. Cheng, J. Zhang, A. T. Jaime, X. Y. Liu, X. Duan, T. L. Li, H. M. Sun (2014) Transcriptome analysis of carbohydrate metabolism during bulblet formation and development in *Lilium davidii* var. unicolor. *BMC Plant Biology* 14:358. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0358-4>
- Miao Y., Z. Zhu, Q. Guo, X. Yang, L. Liu, Y. Sun and C. Wang (2016) Dynamic changes in carbohydrate metabolism and endogenous hormones during *Tulipa edulis* stolon development into a new bulb. *Journal of Plant Biology* 59(2): 121-132.
- Li W., D. Huang, B. Wang, X. Hou, R. Zhang, M. Yan and W. Liao (2022) Changes of starch and sucrose content and related gene expression during the growth and development of Lanzhou lily bulb. *PLOS ONE* 17(1):1-12 e0262506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262506>
- Plaxton W. C. and M. W. Shane (2015) The role of post-translational enzyme modifications in the metabolic adaptations of phosphorus-deprived plants. *In: Plaxton W. C. and H. Lambers (eds.) Annual Plant Reviews. Phosphorus metabolism in plants.* Hoboken: Wiley-Blackwell, (48):237-264.
- Qu J., S. Xu, Z. Zhang, G. Chen, Y. Zhong, L. Liu, R. Zhang, J. Xue and D. Guo (2018) Evolutionary, structural and expression analysis of core genes involved in starch synthesis. *Scientific Reports* 8(1):1-16. DOI:10.1038/s41598-018-30411-y
- Ranwala A. P. and W. B. Miller (2008) Analysis of nonstructural carbohydrates in storage organs of 30 ornamental geophytes by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *New Phytologist*. 2(180):421-433. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02585.x>.

- SAS Institute Inc. (2023) SAS OnDemand for Academics. Disponible en [https://www.sas.com/en\\_us/software/on-demand-for-academics.html](https://www.sas.com/en_us/software/on-demand-for-academics.html).
- Smith A. M. and S. C. Zeeman (2020) Starch: a flexible, adaptable carbon store coupled to plant growth. *Annual Review of Plant Biology* 71:217-245. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100241>
- Sumaryono, W. Muslihatin and D. Ratnadewi (2012) Effect of carbohydrate source on growth and performance of *in vitro* sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) plantlets. *HAYATI Journal of Biosciences* 19:88-92.
- Vance C. P., C. Uhde-Stone, D. L. Allan (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157(3):423-47.
- Wei X., Y. Zhang, M. Ma, X. Jiang, H. Chen, J. Wu, Y. Yang and J. Cai (2024) Changes of non-structured carbohydrate and starch metabolizing enzyme in bulbs of *Lycoris radiata* within the annual growth cycle. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition)* 48(1):106-114. DOI: 10.12302/j.issn.1000-2006.202201008
- Wu Y., Y. Xia, J. Zhang, F. Du, L. Zhang, Y. Ma and H. Zhou (2016) Low humic acids promote *in vitro* lily bulblet enlargement by enhancing roots growth and carbohydrate metabolism. *Biomedicine & Biotechnology* 17(11):892-904.
- Wu Y., Z. Ren, C. Gao, M. Sun, S. Li, R. Min, J. Wu and D. Li (2021) Change in Sucrose Cleavage Pattern and Rapid Starch Accumulation Govern Lily Shoot-to-Bulblet Transition *in vitro*. *Frontiers in Plant Science* 11: 1-15.
- Zhao Y., C. Liu, J. Sui, J. Liang, J. Ge, J. Li, W. Pan, M. Yi, Y. Du and J. Wu (2022) A wake-up call: signaling in regulating ornamental geophytes dormancy. *Ornamental Plant Research* 2(8): 1-10 doi: 10.48130/OPR-2022-0008.

### CAPÍTULO III

## TEMPERATURA BAJA Y ABA INDUCEN LATENCIA *in vitro* EN BULBOS DE *Sprekelia formosissima*

### Resumen

*Sprekelia formosissima* es una geófito con potencial ornamental. El protocolo de micropropagación de esta planta bulbosa debe considerar la inducción y rompimiento de la latencia que permita la acumulación de carbohidratos no estructurales (CNE) para el crecimiento rápido en la brotación. En otras especies geófitas, la latencia y formación de bulbos se logra con temperaturas bajas y ABA. El objetivo del experimento fue estudiar la latencia, crecimiento y CNE en bulbos de *S. formosissima in vitro* a 25 °C con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad (25-L) y 10 °C en oscuridad (10-O) con 0.0, 0.1, 0.5 y 1.0 mg L<sup>-1</sup> de ABA. Los bulbillos se cultivaron 12 semanas en medio MS con 7 % de sacarosa. Se registraron el peso acumulado y diámetro de bulbo, número, peso y longitud promedio y mayor de hojas y raíces. En bulbos, se midió almidón, sacarosa, fructosa, azúcares solubles totales (AST) y reductores. Con los datos se realizó un ANDEVA y la prueba de Tukey (p≤0.05). La formación de hojas y raíces disminuyó con 10-O sin ABA. El mayor número de hojas (1.90), raíces (11.44) y longitud de raíz más larga (5.45 cm) se registró a 25-L sin ABA. El peso acumulado (0.268 g), diámetro de bulbo (7.36 mm), longitud de hojas más larga (7.65 cm), número (6.10), longitud promedio (2.91 cm), peso fresco de raíces (5.72 g) y almidón (150.24 mg / g peso fresco) aumentaron sin ABA. Con 1 mg L<sup>-1</sup> de ABA se registró 61 % más sacarosa y 81 % más fructosa en comparación con bulbos sin ABA. A 10-O los AST, sacarosa y fructosa incrementaron (16.90, 8.00 y 1.86 mg / g peso fresco, respectivamente) y el almidón disminuyó (126.55 mg / g peso fresco). El ABA y temperatura baja inducen latencia en bulbos de *S. formosissima in vitro*, con incremento de azúcares solubles y disminución de almidón.

Palabras clave: latencia, carbohidratos no estructurales, micropropagación de bulbos.

## LOW TEMPERATURE AND ABA INDUCE *in vitro* DORMANCY IN *Sprekelia formosissima* BULBS

### Abstract

*Sprekelia formosissima* is a geophyte with ornamental potential. The micropropagation protocol of this bulbous plant must consider the induction and breaking of dormancy to allow the accumulation of non-structural carbohydrates (NSC) for rapid growth in budding. In other geophyte species, dormancy and bulb formation is achieved with low temperatures and ABA. The aim was to study the dormancy, growth and NSC in *S. formosissima* bulbs *in vitro* at 10 °C in darkness (10-O) and 25 °C with a 16/8 h light/dark photoperiod (25-L) and with 0.0, 0.1, 0.5 and 1.0 mg L<sup>-1</sup> of ABA. The bulblets were grown for 12 weeks in MS medium with 7% sucrose. The accumulated weight and diameter of the bulb, the number, weight and average and longest length of leaves and roots were recorded. In bulbs, starch, sucrose, fructose, total soluble sugars (AST) and reducing were measured. An ANOVA and Tukey test were performed with the data ( $p \leq 0.05$ ). Leaf and root formation decreased with 10-O without ABA. The highest number of leaves (1.90), roots (11.44) and longest root length (5.45 cm) were recorded at 25-L without ABA. Accumulated weight (0.268 g), bulb diameter (7.36 mm), longest leaf length (7.65 cm), number (6.10), average length (2.91 cm), root fresh weight (5.72 g), and starch (150.24 mg/g fresh weight) increased without ABA. With 1 mg L<sup>-1</sup> of ABA, 61% more sucrose and 81% more fructose were recorded compared to bulbs without ABA. At 10-O, AST, sucrose and fructose increased (16.90, 8.00 and 1.86 mg/g fresh weight, respectively) and starch decreased (126.55 mg/g fresh weight). ABA and low temperature induce dormancy in *S. formosissima in vitro* bulbs and increase soluble sugars and decrease starch.

Keywords: dormancy, nonstructural carbohydrates, bulb micropropagation.

## Introducción

Las plantas ornamentales bulbosas dominan la floricultura mundial ya que ofrecen ventajas como bajo costo de mantenimiento, respuesta eficiente a una gran variedad de suelos, climas y latitudes, lo que las hace una opción atractiva para los floricultores y exportadores. Las más cultivadas son tulipán, lili, narciso, jacinto y gladiola (Gul *et al.*, 2020) aunque existen especies bulbosas nativas en México con potencial ornamental, como *Sprekelia formosissima* (Cázarez *et al.*, 2010) que puede incorporarse como una opción comercial al mercado ornamental nacional e internacional.

La incorporación de nuevas especies al mercado florícola requiere la generación de protocolos de propagación del germoplasma de interés, en el caso de *S. formosissima*, hay reportes de trabajos para estudiar la micropropagación de bulbos de esta especie, aunque aún no se conoce bien el proceso de desarrollo de los bulbos.

Los protocolos de micropropagación de especies geófitas deben incluir estrategias para el manejo de la latencia ya que, las plantas bulbosas siguen una periodicidad fenológica perfectamente sincronizada alternando latencia, crecimiento vegetativo y floración (Gul *et al.*, 2020). En las plantas bulbosas, es frecuente que los bulbos obtenidos *in vitro* no requieran un tratamiento para enraizar ni para la aclimatación, pero si un tratamiento para inducir y romper la latencia, previo a la plantación (De Klerk, 2012). La latencia es un fenómeno en el que cesa el crecimiento y se detiene parcialmente el metabolismo, regulado por la temperatura, luz y hormonas. Se han identificado tres tipos de especies bulbosas en función del tipo de latencia: 1) latencia tipo lili que se caracteriza por un periodo largo de latencia en el cual se detiene la elongación y la formación de nuevos órganos. El rompimiento de la latencia es lento y puede durar varios meses, además se requiere el tratamiento con frío para completarla. Algunos ejemplos son lili, cebolla y gladiola, 2) latencia tipo tulipán que es inducida rápidamente después de la floración para prevenir la elongación del tallo, narciso, tulipán y jacinto tienen este tipo de latencia y 3) bulbos sin latencia fisiológica verdadera que es controlada por factores ambientales como temperatura y humedad, en lugar de factores fisiológicos, las

plantas con este tipo de latencia reactiva su crecimiento cuando las condiciones ambientales son favorables como en iris (Gul *et al.*, 2020).

El bulbo es un órgano importante de almacenamiento en geófitas ornamentales como lili, este órgano acumula una gran cantidad de almidón y azúcares solubles que sirven como fuente de nutrientes y energía durante la latencia del bulbo y el crecimiento posterior de las yemas en la brotación (Yang *et al.*, 2015). Okubo (2000) propuso que la latencia de los bulbos y la inducción de formación de estos órganos son fenómenos simultáneos en las plantas geófitas. En jacinto cultivado *in vitro* la formación de bulbos es inducida a 5 °C o con 1 mg L<sup>-1</sup> de ABA y 25 °C de temperatura, el desarrollo de hojas sin formación de bulbos es inducido a 25 °C o con el inhibidor de ABA, fluridona a 5 °C. Es posible que algunos genes específicos que inducen la formación del bulbo en jacinto sean expresados por el incremento del contenido de ABA como respuesta a temperaturas bajas (li *et al.*, 2002). El ABA esta correlacionado con la latencia en plantas y es esencial en la respuesta al estrés (Giraudat *et al.*, 1994).

En *Iris*, el inicio de la floración ocurre a temperaturas relativamente bajas (13 °C) mientras que a temperaturas altas (26 °C) los bulbos permanecen vegetativos (Gul *et al.*, 2020). En lilis la latencia se rompe cuando los bulbos se exponen a 5 °C por algunas semanas (De Klerk, 2012). Cuando los bulbos de *S. formosissima* se riegan continuamente, se producen hojas durante todo el año en condiciones de invernadero. En cultivo *in vitro*, con todas las condiciones óptimas los bulbos no entran en latencia lo que podría afectar el crecimiento potencial de los bulbillos que pueden requerir el paso por esta etapa para alcanzar un mayor tamaño y acumular carbohidratos no estructurales que sirvan como fuente de energía en la brotación. Por lo anteriormente expuesto, el objetivo de este ensayo fue estudiar el efecto del ABA y la temperatura baja sobre la acumulación de carbohidratos no estructurales y la latencia en bulbos de *Sprekelia formosissima* cultivados *in vitro*.

## **Materiales y métodos**

En este experimento, los bulbillos fueron cultivados en medio MS con 7 % de sacarosa con dos condiciones de incubación (25 °C con 130 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de

intensidad de luz con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad y 10 °C en oscuridad) y cuatro concentraciones de ácido abscísico (0, 0.1, 0.5 y 1.0 mg L<sup>-1</sup>) en el medio de cultivo (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Tratamientos para evaluar el efecto de la temperatura y ácido abscísico sobre el metabolismo del carbono y crecimiento de bulbos de *S. formosissima* cultivados *in vitro*.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Ácido abscísico (mg L <sup>-1</sup> )
1	25 °C con luz	0
2	25 °C con luz	0.1
3	25 °C con luz	0.5
4	25 °C con luz	1.0
5	10 °C en oscuridad	0
6	10 °C en oscuridad	0.1
7	10 °C en oscuridad	0.5
8	10 °C en oscuridad	1.0

### Variables evaluadas y diseño experimental

A las 12 semanas se registró el peso acumulado y diámetro de bulbo, número de raíces y hojas, peso y longitud promedio y mayor de hojas y raíces. En los bulbos también se midió la concentración de almidón, azúcares solubles totales, azúcares reductores, sacarosa y fructosa. La disposición de las unidades experimentales se realizó bajo un diseño en bloques completos al azar con 10 repeticiones, la unidad experimental consistió en un frasco con 25 mL de medio de cultivo con un bulbillito por frasco, modificado de acuerdo con los tratamientos. Las unidades experimentales fueron dispuestas en diez bloques de acuerdo con el peso de los bulbos que en promedio fueron de 0.23, 0.26, 0.28, 0.35, 0.47, 0.49, 0.50, 0.64, 0.65 y 0.95 g. La medición de los carbohidratos no estructurales se realizó como se describió en el capítulo I donde se probó diferente intensidad de luz.

## **Análisis estadístico**

Los datos de las variables registradas que no mostraron normalidad con la prueba de Shapiro-Wilks y/u homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene se transformaron.

Los datos de concentración de sacarosa no mostraron homogeneidad de varianzas y fueron transformados con  $\log [z + \sqrt{(z^2 + 1)}]$ . El peso fresco y longitud promedio de hojas y raíces se transformaron con  $\log [1/z + \sqrt{(1/z^2 + 1)}]$ , los datos de peso acumulado, longitud de hojas más larga con  $1/z$ , número de raíces con  $\log [z + \sqrt{(z^2)/2}]$  y diámetro con  $\log (z + 1)$ . Con los datos transformados se corroboró la homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene. En las variables peso acumulado, peso fresco y longitud promedio de hojas y número de raíces se probó la normalidad de los datos con la prueba de Shapiro-Wilks. Para peso fresco y longitud promedio de raíces y diámetro de bulbo se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov y para longitud de hoja más larga la prueba de Cramer Von Mises. Los registros de número de hojas y longitud de raíz más larga no se normalizaron ni mostraron varianzas homogéneas con ninguna transformación por lo que se realizó un análisis de varianza y prueba de medias de Tukey por rangos.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza con un nivel de significancia de  $\alpha \leq 0.05$  y la prueba de medias de Tukey con el programa SAS OnDemands for Academics® (SAS, 2023).

## **Resultados y discusión**

### **Variables morfológicas**

El análisis de varianza mostró efecto altamente significativo de la interacción de los factores sobre el número de raíces. Esta misma variable, el peso acumulado en los bulbos, diámetro de bulbo, longitud de hoja más larga, peso fresco y longitud promedio de raíces fueron estadísticamente diferentes por efecto de la concentración de ácido abscísico en el medio de cultivo. Las condiciones de

temperatura y luz influyeron sobre el número raíces que formaron los bulbos (Cuadro 9). El análisis de varianza por rangos indicó que el número de hojas y longitud de raíz fue diferente por efecto de los tratamientos (Cuadro 4A y 5A).

**Cuadro 9.** Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto de la temperatura y la concentración de ácido abscísico sobre el crecimiento de bulbos de *S. formosissima* cultivados *in vitro*.

Factor de variación	Grados de libertad	PAB (g)	DB (mm)	PFH (g)	LPH (cm)	LHL (cm)	NR	PFR (g)	LPR (cm)
ABA	3	7.94**	0.12**	3.62 <sup>NS</sup>	0.175 <sup>NS</sup>	0.363*	1.197**	7.17*	2.40**
Temperatura (T)	1	1.09 <sup>NS</sup>	0.009 <sup>NS</sup>	0.24 <sup>NS</sup>	0.066 <sup>NS</sup>	0.030 <sup>NS</sup>	3.754**	6.27 <sup>NS</sup>	0.33 <sup>NS</sup>
Interacción ABA*T	3	1.09 <sup>NS</sup>	0.010 <sup>NS</sup>	0.41 <sup>NS</sup>	0.027 <sup>NS</sup>	0.092 <sup>NS</sup>	0.661**	3.97 <sup>NS</sup>	0.12 <sup>NS</sup>
Bloque	4	0.98 <sup>NS</sup>	1.35**	1.97 <sup>NS</sup>	0.13 <sup>NS</sup>	0.198 <sup>NS</sup>	0.588**	5.36*	0.57*
R <sup>2</sup>		0.51	0.91	0.68	0.85	0.87	0.84	0.71	0.76
CV		33.83	6.96	32.68	43.05	46.01	22.54	34.58	41.30

CV = coeficiente de variación, R<sup>2</sup> = coeficiente de determinación, <sup>NS</sup> = diferencia no significativa, \* y \*\* = diferencias significativas a P ≤ 0.05 y P ≤ 0.01, respectivamente. PAB = peso acumulado en bulbo, DB = diámetro de bulbo, PFH = peso fresco de hojas, LPH = longitud promedio de hojas, LHL = longitud de hojas más larga, NR = número de raíces, PFR = peso fresco de raíces y LPR = longitud promedio de raíces. Los datos de PFH, LPH y LPR [ $\log \{1/z + \sqrt{(1/z^2 + 1)}\}$ ], PAB, LHL (1/z) y DB [ $\log(z+1)$ ] se transformaron para realizar el análisis de varianza.

El número de raíces disminuyó con 10 °C en oscuridad con y sin ácido abscísico. Estas condiciones de incubación no son suficientes para reducir la longitud de las raíces, lo que si ocurre cuando se adiciona ABA al medio de cultivo. El número de hojas se redujo con 10 °C en la oscuridad y con 25 °C con luz y con las concentraciones media y alta de ABA. En contraste los bulbos cultivados en medio sin ácido abscísico a 25 °C con luz produjeron el mayor número de raíces (11.44) con mayor longitud (5.45 cm) y más hojas (1.9) (Cuadro 10) (Figura 9).









**Cuadro 10.** Efecto de la temperatura baja y la concentración de ácido abscísico sobre el número de hojas y raíces formadas en bulbos de *S. formosissima* cultivados *in vitro*.

Temperatura/luz	ABA (mg L <sup>-1</sup> )	Número de raíces	Número de hojas	Longitud de raíz más larga (cm)
25° con luz	0.0	11.44 a	1.90 a	5.45 a
25° con luz	0.1	6.0 ab	0.70 ab	2.47 ab
25° con luz	0.5	2.8 ab	0.40 bc	1.28 ab
25° con luz	1.0	2.6 ab	0.10 bc	0.65 ab
10° en oscuridad	0.0	0.8 c	0.40 bc	1.95 ab
10° en oscuridad	0.1	0.5 c	0.20 bc	0.40 c
10° en oscuridad	0.5	0.1 c	0.00 c	0.30 c
10° en oscuridad	1.0	0.2 c	0.10 bc	0.25 c
DSH		3.16	0.68	4.90

Medias con letras iguales en columnas no son estadísticamente diferentes. (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). DSH: diferencia significativa honesta para los datos sin transformar para número de raíces.

Las variables morfológicas registradas mostraron los valores más altos en los bulbos cultivados sin ácido abscísico, con la adición y el incremento de la concentración de esta hormona el crecimiento se detuvo, lo que se vio reflejado en la disminución de la expresión de todas las variables. El peso acumulado fue casi 5 veces menor con 1.0 mg L<sup>-1</sup> de ABA y el diámetro del bulbo pasó de 7.36 a 6.23 con 0.5 mg L<sup>-1</sup>, aunque fue estadísticamente igual a la concentración de ABA más alta. La longitud de la hoja más larga fue estadísticamente igual con las concentraciones de 0, 0.1 y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ABA y 89 % más pequeña con la concentración de ABA más alta en comparación con los bulbos expuestos a medio de cultivo sin ABA. El número, longitud promedio y peso fresco de raíces disminuyó 77, 87 y 50 % con 1.0 mg L<sup>-1</sup> de ABA en comparación con los valores más altos registrados en estas variables (Cuadro 11). Un efecto similar por el uso de ABA fue registrado en bulbos de *Eucomis zambesiaca* en los que el incremento de la concentración *in vitro* de ABA redujo su tamaño de 1.40, a 1.22 y 1.22 cm de diámetro y de 8.35 a 7.13 y 5.88 g de peso con 3.78, 7.57 y 18.92  $\mu$ M de ABA, respectivamente (Cheesman *et al.*,

2010). El ABA induce la degradación de almidón para formar azúcares solubles que se utilizan en el metabolismo, que está activo aún en la etapa de latencia, la disminución del almidón podría explicar la pérdida de peso en los bulbos, ya que es la principal forma de acumulación de biomasa en estos órganos.

Temperatura/luz	Ácido abscísico (mg L <sup>-1</sup> )			
	0	0.1	0.5	1.0
25 °C con luz				
10 °C sin luz				

**Figura 9.** Bulbos de *S. formosissima* cultivados *in vitro* con diferentes concentraciones de ácido abscísico y condiciones de temperatura y luz. La barra horizontal debajo de los bulbos representa 1 cm.

**Cuadro 11.** Efecto de la concentración de ácido abscísico sobre el crecimiento de bulbo, hojas y raíces en *S. formosissima* cultivada *in vitro*.

ABA (mg L <sup>-1</sup> )	Peso acumulado (g)	Diámetro de bulbo (mm)	Longitud de hoja más larga (cm)	No. Raíces	Longitud promedio de raíces (cm)	Peso raíces (g)
0	0.268 a	7.36 a	7.65 a	6.10 a	2.91 a	5.72 a
0.1	0.123 b	6.57 ab	3.68 a	3.25 ab	1.34 ab	4.31 bc
0.5	0.057 c	6.23 b	3.77 a	1.45 bc	0.77 bc	4.96 a
1.0	0.054 bc	6.51 b	0.80 b	1.40 c	0.37 c	2.86 c
DSH	0.1132	0.7564	11.83	1.88	1.315	1.78

Medias con letras iguales en columnas no son estadísticamente diferentes. (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). DSH: diferencia significativa honesta para los datos sin transformar.

Las condiciones de incubación con temperatura de 10 °C en oscuridad inhibieron la formación de raíces (Cuadro 12). Los resultados encontrados en este ensayo demuestran que el ácido abscísico y la temperatura tienen un efecto en la latencia de los bulbos de *S. formosissima* ya que inhiben la formación de hojas y raíces, aunque el incremento en la concentración de ácido abscísico disminuye el peso y crecimiento del bulbo.

**Cuadro 12.** Efecto de la temperatura y luz sobre el número de hojas y raíces en bulbos de *S. formosissima* cultivados *in vitro*.

Temperatura/luz	No. Raíces
25° con luz	5.70 a
10° en oscuridad	0.40 b
DSH	1.00

Medias con letras iguales en columnas no son estadísticamente diferentes. (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). DSH: diferencia significativa honesta.

Una respuesta similar se reportó en jacinto (*Hyacinthus orientalis* L. 'Delft Blue') en donde 70 % de los explantes incubados por cuatro semanas a 25 °C seguido de ocho semanas a 5 °C formaron bulbos, mientras que en los explantes sin tratamiento con frío se observó menos de 20 % de brotes con bulbos. El ácido

abscísico promovió la latencia y formación de bulbos en explantes incubados sin frío, a las 22 semanas se alcanzó 35, 58, 75 y 50 % de brotes con bulbos con 0, 0.1, 1.0 y 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido abscísico, respectivamente (Li *et al.*, 2002). En este experimento con *S. formosissima* también se registró un efecto negativo, no en la formación de bulbos, pero sí en su crecimiento, ya que el incremento en la concentración de ácido abscísico en el medio de cultivo a 0.5 y 1.0 mg L<sup>-1</sup> produjo pérdida de biomasa en estos órganos.

### **Acumulación de carbohidratos en bulbos**

El análisis de varianza para el efecto de la concentración de ácido abscísico, las condiciones de cultivo (10 °C en oscuridad y 25 °C con luz) y la interacción de ambos factores mostró que solo los factores independientes tuvieron efecto significativo sobre la concentración de almidón, sacarosa y fructosa en los bulbos y solo las condiciones de incubación sobre los azúcares solubles totales (Cuadro 13).

El contenido de almidón en bulbos fue mayor sin ácido abscísico en el medio de cultivo y estadísticamente similar cuando se adicionó 0.1 y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de la hormona al medio de cultivo. Contrario a estos resultados la adición y el incremento de ácido abscísico promovieron una mayor acumulación de sacarosa y fructosa en el medio de cultivo (Cuadro 14). Estos resultados demuestran que el ABA estimula la degradación de almidón y la formación de azúcares solubles a partir de este polisacárido, estos azúcares pueden ser utilizados como fuente de carbono durante la latencia y para proveer de la energía necesaria en la brotación, por lo que el uso de ABA puede servir para preparar al bulbo para la brotación aunque no deben usarse concentraciones altas, iguales o mayores a 1 mg L<sup>-1</sup> de este inhibidor de crecimiento ya que provocan la reducción del tamaño y peso del bulbo.

**Cuadro 13.** Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto de la temperatura y la concentración de ácido abscísico sobre el contenido de carbohidratos en bulbos de *S. formosissima* cultivados *in vitro*.

Factor de variación	Grados de libertad	Almidón Azúcares solubles Azúcares reductores Sacarosa Fructosa				
		(mg / g tejido fresco)				
ABA	3	1156.33*	69.28 <sup>NS</sup>	0.081 <sup>NS</sup>	0.34*	2.39*
Temperatura (T)	1	2590.33*	183.06*	0.008 <sup>NS</sup>	0.43*	2.78*
Interacción ABA*T	3	173.65 <sup>NS</sup>	17.46 <sup>NS</sup>	0.012 <sup>NS</sup>	0.02 <sup>NS</sup>	0.82 <sup>NS</sup>
Bloque	4	353.87 <sup>NS</sup>	34.53 <sup>NS</sup>	0.265 <sup>NS</sup>	0.19 <sup>NS</sup>	0.45 <sup>NS</sup>
R <sup>2</sup>		0.52	0.32	0.35	0.56	0.45
CV		14.07	35.10	14.04	10.34	39.65
Observaciones utilizadas		35	39	37	35	34

CV = coeficiente de variación, R<sup>2</sup> = coeficiente de determinación, <sup>NS</sup> = diferencia no significativa, \* y \*\* = diferencias significativas a P ≤ 0.05 y P ≤ 0.01, respectivamente. Los datos de sacarosa [ $\log \{z + \sqrt{(z^2 + 1)}\}$ ] se transformaron para realizar el análisis de varianza.

El ABA promovió un efecto distinto en cormos de gladiolo expuestos a esta hormona, en los que se registró un incremento simultáneo de sacarosa, almidón y el crecimiento de estos órganos (Li *et al.*, 2021). Esto confirma que los factores que regulan el metabolismo del almidón actúan de forma diferente en cada especie (Zeeman *et al.*, 2010).

**Cuadro 14.** Efecto de la concentración de ácido abscísico sobre el contenido de carbohidratos no estructurales en bulbos de *S. formosissima* cultivados *in vitro*.

ABA (mg L <sup>-1</sup> )	Almidón	Sacarosa	Fructosa
	(mg / g tejido fresco)		
0	150.24 a	6.23 b	1.44 b
0.1	138.84 ab	8.97 ab	2.16 ab
0.5	130.37 ab	10.10 a	2.38 ab
1.0	118.85 b	10.03 a	2.60 a
DSH	25.35	3.22	1.15

Medias con letras iguales en columnas no son estadísticamente diferentes. (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). DSH: diferencia significativa honesta.

La disminución de la temperatura tuvo un efecto similar al ácido abscísico sobre la concentración de almidón y azúcares solubles en los bulbos ya que con 10 °C en oscuridad los bulbos acumularon menos almidón, aunque se incrementó el contenido de sacarosa, fructosa y azúcares solubles totales (Cuadro 15).

En condiciones de temperaturas bajas el metabolismo de los carbohidratos es extremadamente activo y la sacarosa es el azúcar soluble que predomina sobre la glucosa y fructosa (Yu *et al.*, 2022), en el caso de lilis se ha reportado que, durante el almacenamiento de bulbos en temperaturas bajas, se aceleran la conversión de almidón a sacarosa y la acumulación de azúcares en estos órganos (Zhang *et al.*, 2011).

**Cuadro 15.** Efecto de la temperatura sobre el contenido de carbohidratos no estructurales en bulbos de *S. formosissima* cultivados *in vitro*.

Temperatura/luz	Almidón	Azúcares		
		solubles totales	Sacarosa	Fructosa
(mg /g tejido fresco)				
25° con luz	146.33 a	16.90 b	8.00 b	1.86 b
10° en oscuridad	126.55 b	21.57 a	10.05 a	2.54 a
DSH	13.39	4.42	1.7	0.61

Medias con letras iguales en columnas no son estadísticamente diferentes. (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). DSH: diferencia significativa honesta.

En un experimento realizado con dos variedades de lilis comestibles ‘Fly Shaohua’ y ‘Fly Tiancheng’, los bulbos almacenados a 4 °C por 75 días mostraron una disminución de más de 50 % del contenido de almidón y un incremento en el contenido de sacarosa en los bulbos de 64.36 a 106.02 y de 27.31 a 114.81 mg g<sup>-1</sup> de peso fresco en ‘Fly Shaohua’ y ‘Fly Tiancheng’, respectivamente. De forma similar, la actividad de las enzimas sacarosa fosfato sintasa y sacarosa sintasa se incrementó. El análisis del transcriptoma mostró cambios altamente dinámicos en un gran número de genes de enzimas del metabolismo del almidón y la sacarosa, durante el almacenamiento en frío de los bulbos. La expresión de unigenes (AMY: CL4373.Contig2\_All, Unigene346\_All; BAM: Unigene10480\_ALL, CL1792.Contig5\_ALL;  $\alpha$ -GPs: Unigene28222\_All, CL2557.Contig1\_All) relacionados con la degradación de almidón se incrementó a los 15 y 45 días lo que podría acelerar la conversión de almidón a glucosa-1-P que luego fue catalizada por la acumulación de UGPasa (CL2453.Contig2\_All, Unigene6189\_All) para generar UDPG, que es un sustrato importante para la síntesis de sacarosa. Finalmente, los contenidos alto de SPS y SPP catalizaron la reacción donde se produce sacarosa a partir de la UDPG. Estos patrones de expresión de genes involucrados en las rutas metabólicas del almidón y sacarosa explican bien la degradación del almidón y la acumulación de la sacarosa durante el almacenamiento de los bulbos de lili en frío (Yu *et al.*, 2022) lo cual podría explicar la acumulación de sacarosa y la disminución del almidón en bulbos de *Sprekelia formosissima* cultivados *in vitro* a bajas temperaturas.

## Conclusiones

El ABA y la temperatura baja estimulan la latencia de los bulbos de *S. formosissima* cultivados *in vitro*, estos factores inhiben la formación de hojas y raíces en los bulbos e incrementan el contenido de azúcares solubles y disminuyen la concentración de almidón en estos órganos de reserva. Estos resultados pueden servir para diseñar otros experimentos para explorar el uso de ABA y temperatura baja en la acumulación de almidón y biomasa en bulbos de *S. formosissima*.

## Literatura citada

- Cázarez P. M. R. M. Andrade, M. A. Villegas, T. I. Alia, T. O. G. Villegas and M. V. López (2010) *In vitro* propagation of *Sprekelia formosissima* Herbert, a wild plant with ornamental potential. *Revista Fitotecnia Mexicana* 3(33):197-203.
- Cheesman L., J. J. Finnie, and J. Van Staden (2010) *Eucomis zambesiaca* Baker: factors affecting *in vitro* bulblet induction. *South African Journal of Botany* 3(76):543–549. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.04.004>.
- De Klerk G. J. (2012) Micropropagation of bulbous crops: Technology and present state. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 6 (Special issue):1-8.
- Giraudat, J., F. Parcy, N. Bertauche, F. Gosti, J. Leung, P. C. Morris, M. Bouvier-Durand and N. Vartanian (1994) Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Molecular Biology* 26:1557-1577.
- Gul F., W. Shahri and I. Tahir (2020) Bulbous Ornamentals: Role and Scope in the Floriculture Industry *In: The Global Floriculture Industry. Shifting Directions, New Trends and Future Prospects*, K. R. Hakeem Ed. pp. 15-38 p.
- li K., H. Okubo and T. Matsumoto (2002) Control of bulb dormancy in hyacinth - A molecular biological approach. *Acta Horticulturae* 570: 241-246.
- Okubo H. (2000) Growth cycle and dormancy in plants. *In: J. D. Viemont and J. Crabbe (eds.). Dormancy in plants: From whole plant behavior to cellular control*, pp. 1-22, CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire.
- SAS Institute Inc. (2023) SAS OnDemand for Academics. Disponible en [https://www.sas.com/en\\_us/software/on-demand-for-academics.html](https://www.sas.com/en_us/software/on-demand-for-academics.html).
- Yang C., Q. Li, X. Jiang, Y. Fan, J. Gao and C. Zhang (2015) Dynamic changes in alpha- and beta-amylase activities and gene expression in bulbs of the

- Oriental hybrid lily 'Siberia' during dormancy release. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 90:753-759.
- Yu, J., S. Xu, X. Liu, T. Li, D. Zhang, N. Teng and Z. Wu (2022) Starch Degradation and Sucrose Accumulation of Lily Bulbs after Cold Storage. *International Journal of Molecular Sciences* 2022(23):4366. <https://doi.org/10.3390/ijms23084366>
- Zhang, Y. J., Z. K. Xie, Y. J. Wang and L. P. An (2011) Changes in Carbohydrate Metabolism and Bulb Growth as Induced by Low-Temperature Release of Dormancy in Lily Bulbs. *Philippine Agricultural Scientist* 2011(94):149-154.
- Zeeman S. C., J. Kossmann and A. M. Smith (2010) Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annual Review of Plant Biology* 61: 209-234.

## V. DISCUSIÓN GENERAL

Las geófitas ornamentales también llamadas flores bulbosas contribuyen significativamente a la industria ornamental y son utilizadas para la producción de flor de corte, en maceta y jardinería. En 2022, el valor de la producción de plantas bulbosas fue de 1.82 billones de euros y aunque existen más de 800 géneros de bulbosas, la producción y comercialización de estas plantas sigue dominada por *Tulipa*, *Lilium*, *Narcissus*, *Gladiolus*, *Hyacinthus*, *Crocus* e *Iris* (Yasemin y Beruto, 2024).

*Sprekelia formosissima*, una geófito con potencial ornamental, puede ser una opción para los consumidores que demandan nuevas formas y colores en las plantas bulbosas ornamentales que se producen a nivel mundial. El inconveniente para introducir esta especie al mercado de las ornamentales es la generación de protocolos de propagación masiva del germoplasma.

Las técnicas tradicionales de propagación vegetativa de esta especie se basan en la división de los órganos de reserva, aunque la tasa natural de multiplicación por bulbos es muy lenta, por lo que se requieren métodos alternativos como el cultivo *in vitro*. Se han desarrollado sistemas de micropropagación para *S. formosissima*, pero no han tenido aplicación comercial por la dificultad que presentan las plántulas para formar bulbos, contrario a lo que ocurre en los métodos de micropropagación generados para *Lily* y *Zantadeschia* (De Klerk, 2012).

En la presente investigación se estudió el efecto de los componentes del medio de cultivo (concentraciones de sacarosa, fósforo y uso de inhibidores del crecimiento vegetal) y variables ambientales como la intensidad de luz y temperatura para acelerar el proceso de formación de bulbos en plántulas de *S. formosissima* bajo condiciones *in vitro*.

Los resultados registrados en el primer ensayo de esta investigación muestran que el incremento en la intensidad de luz a  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  promueve la acumulación de almidón y aumenta el peso y diámetro de los bulbos de *S. formosissima in vitro* en 251, 152 y 44 %, respectivamente en comparación con los

bulbos cultivados en oscuridad. En el segundo ensayo, los bulbos de 0.6 a 1.74 g incubados en la oscuridad, perdieron biomasa, lo que confirma que es necesario que estos órganos se cultiven, al menos por un periodo en condiciones de luz, para promover su crecimiento. En los bulbos de *S. formosissima* no se registró diferencia en el contenido de azúcares solubles entre las condiciones de luz y oscuridad, contrario a lo que se ha reportado en otras especies como *Lilium candidum* en la que la oscuridad y la luz azul promovieron la acumulación de azúcares solubles en los bulbos (Pałka *et al.*, 2023).

El almidón almacenado en los bulbos puede ser degradado a azúcares solubles que proveen el carbono y energía para la morfogénesis de la planta (Li *et al.*, 2014) es por esto que, el incremento del contenido de almidón en condiciones de intensidad de luz alta puede utilizarse como estrategia para obtener bulbos de mayor tamaño que dispongan de mayor energía para formar flores vigorosas después de la brotación.

La sacarosa es uno de los factores más importantes que influyen en la morfogénesis de las plantas cultivadas *in vitro* (de Paiva Neto y Otoni, 2003). Estudios previos reportan concentraciones altas de este disacárido asociadas al crecimiento *in vitro* de los bulbillos (Bakhshaie *et al.*, 2010); sin embargo, el tamaño de los bulbos de *S. formosissima* no se vio afectado por el incremento en la concentración de sacarosa en el medio de cultivo (3, 5, 7 y 9 %), esto se debe a que estos órganos se cultivaron en la oscuridad y contrario a lo que ocurre en otras especies, los bulbos de *S. formosissima* requieren de luz con intensidades altas para incrementar su biomasa.

Las concentraciones altas de sacarosa (7 y 9%) en el medio de cultivo promovieron la acumulación de carbohidratos no estructurales (almidón, azúcares solubles totales, sacarosa y fructosa) y una mayor actividad de las enzimas implicadas en la síntesis de almidón (AGPasa, SSS y GBSS) en los bulbos de *S. formosissima*. En *Licorys radiata* la actividad de estas enzimas se incrementa durante el desarrollo de los bulbos que acumulan almidón durante su crecimiento (Xu *et al.*, 2020). La acumulación de almidón en los bulbos de *S. formosissima* coincide con el incremento de la actividad de las enzimas AGPasa, SSS y GBSS,

aunque estudios hechos en órganos de almacenamiento como la papa han demostrado que la actividad de la AGPasa es la clave en la acumulación de almidón ya que es la primera enzima en la ruta para la síntesis de este polisacárido (Lytovchenko y Fernie 2002). En *Licorys radiata* la AGPasa mostró los cambios más significativos entre las tres enzimas en esta especie, lo que confirma un rol dominante de esta enzima en la síntesis de almidón (Xu *et al.*, 2020).

Por otro lado, los datos registrados confirman que, en *S. formosissima* la concentración de P inhibe la actividad enzimática de AGPasa y SSS. En presencia de altas concentraciones de 3-fosfoglicerato, un producto directo de la fotosíntesis, la actividad de la AGPasa es inducida. Cuando el fosfato inorgánico, subproducto de la síntesis de almidón y molécula necesaria para ser intercambiada por glucosa-6-fosfato del citosol, es el que predomina, la actividad de esta enzima es reprimida (Kossmann y Lloyd, 2000), lo que parece explicar la inhibición de esta enzima por la adición de P al medio de cultivo.

En *Lycoris sprengeri* el crecimiento de los bulbos coincide con el incremento del contenido de carbohidratos en estos órganos. Sin embargo, la acumulación de almidón en los bulbillos pequeños hasta los bulbos de mayor tamaño es lenta, a pesar del incremento en la actividad de la enzima SSS, esto puede deberse a la actividad moderada de la AGPasa (Chang *et al.*, 2013), lo que demuestra la importancia de conocer los factores que inhiben la actividad de esta enzima.

Con base en estos resultados se sugiere incrementar la concentración de sacarosa en el medio de cultivo a 7 % y utilizar una intensidad de luz alta en las condiciones ambientales de cultivo *in vitro* de bulbos de *S. formosissima* para aumentar la actividad de AGPasa, SSS y GBSS y promover la acumulación de carbohidratos no estructurales en los bulbos y el crecimiento de estos órganos.

La temperatura es otro factor que influye en la regeneración, formación y la latencia de bulbos *in vitro*. En el caso de las flores bulbosas de clima templado, las temperaturas bajas imitan el invierno y promueven la latencia (Ascough *et al.*, 2008) como ocurrió en los bulbos de *S. formosissima* en los que la disminución de la temperatura a 5° C sin luz inhibió totalmente el crecimiento vegetativo ya que no

formaron hojas ni raíces. Un efecto similar de inhibición del crecimiento se observó al adicionar ABA al medio de cultivo, aunque las plántulas se incubaron a 25 ° C con luz.

La adición de ABA al medio de cultivo y el tratamiento con temperatura baja aumentaron la concentración de azúcares solubles totales, sacarosa y fructosa y disminuyeron el contenido de almidón en los bulbos de *S. formosissima* cultivados *in vitro*. Durante el almacenamiento de los bulbos con temperaturas bajas, el contenido de sacarosa incrementa como resultado de la hidrólisis de almidón (Guy *et al.*, 2008). En *Lilium rubellum* (Xu *et al.*, 2006), *Lilium longiflorum* (Miller y Langhans, 1990), jacinto y tulipán (Moe y Wickstrøm, 1973) expuestos a temperaturas bajas se ha observado un incremento en la concentración de sacarosa y azúcares reductores.

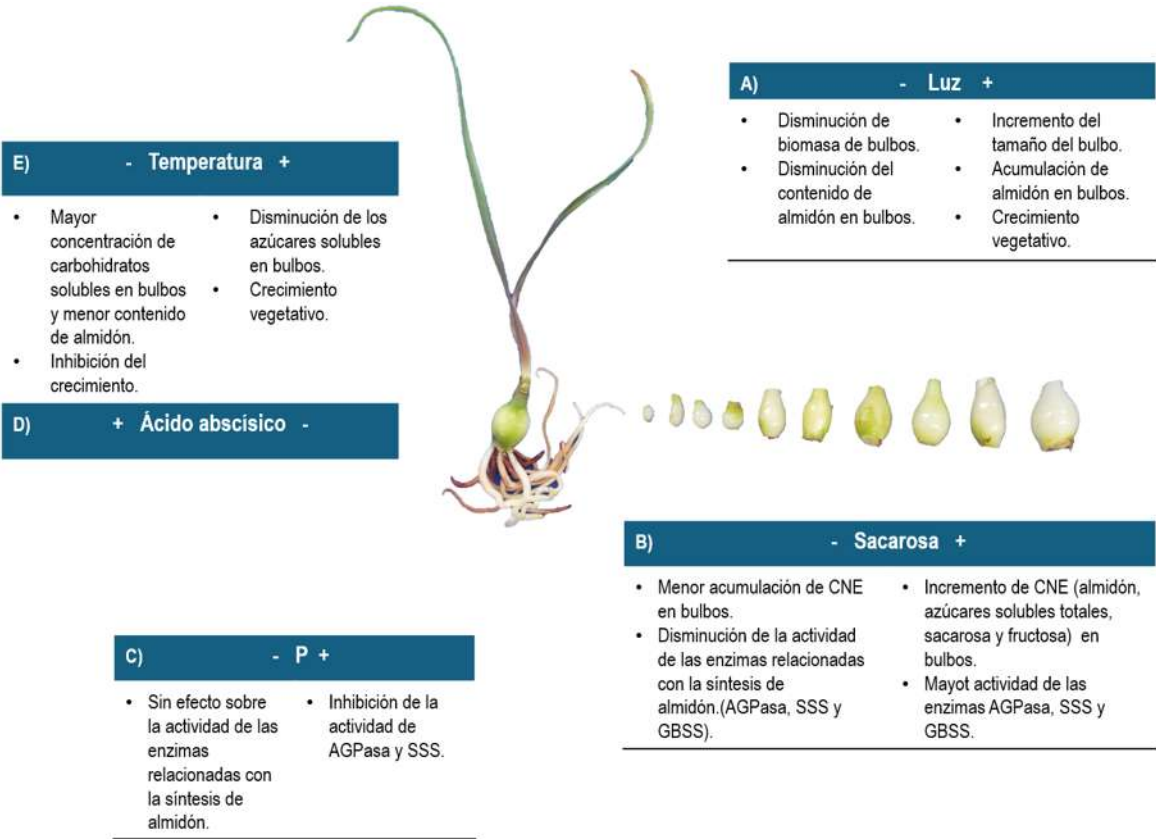
El incremento en el contenido de azúcares solubles totales, sacarosa y fructosa y la inhibición del crecimiento muestran que el tratamiento con frío mantiene en latencia al bulbo, aunque la actividad metabólica no cesa ya que los azúcares solubles como la glucosa y fructosa pueden ser utilizadas en la respiración y como componentes estructurales de las células (Gul *et al.*, 2020). Esto sugiere que la temperatura baja prepara al bulbo para la brotación con la degradación de almidón a azúcares solubles que servirán como fuente de energía en la formación del nuevo brote y la flor y confirma que la presencia de almidón y carbohidratos solubles no solo proveen la energía necesaria para salir de la latencia, sino que también tienen una función como señaladores de esta etapa (Horvath, 2009).

Existe evidencia que demuestra que la temperatura baja promueve la expresión de genes que aumentan el contenido de ABA en los bulbos (Li *et al.*, 2002) lo que explica porque la adición de ABA al medio de cultivo genera un efecto similar a la disminución de la temperatura de incubación en los bulbos de *S. formosissima* cultivado *in vitro*.

Un protocolo eficiente de propagación *in vitro* de geófitas ornamentales debe considerar la inducción y rompimiento de la latencia que permita un crecimiento rápido para una explotación comercial eficiente del material vegetal (Yasemin y Beruto, 2024). Los resultados observados en los bulbos de *S. formosissima* muestran

que el ABA y la temperatura baja pueden utilizarse para la inducción de latencia, aunque debe determinarse el periodo óptimo de exposición a estos factores que permitan una adecuada brotación del bulbo después de su almacenamiento en estas condiciones.

Con base en los resultados de esta investigación se propone un modelo para la dinámica del carbono y el crecimiento de bulbos de *S. formosissima* cultivados *in vitro* que se describe en la Figura 10. Estos hallazgos permitirán optimizar el desarrollo *in vitro* de bulbos de *S. formosissima* que son órganos fáciles de manejar, transportar y almacenar, lo que los hace el material ideal para la propagación masiva de genotipos seleccionados, o que pueden ser utilizados en los programas avanzados de mejoramiento genético.



**Figura 10.** Modelo propuesto para la dinámica del carbono en bulbos de *S. formosissima* y su crecimiento *in vitro* en respuesta a la exposición a cambios en A) la intensidad de luz, B) concentración de sacarosa, C) fósforo, D) ácido abscísico y E) temperatura. CNE = carbohidratos no estructurales.

## VI. CONCLUSIONES GENERALES

Los bulbos de *Sprekelia formosissima* cultivados *in vitro* acumulan almidón y crecen más cuando son cultivados con intensidad de luz alta, en la oscuridad pierden en promedio 36 % de la biomasa inicial con la que son incubados. Esto es un hallazgo importante para la generación de un protocolo de micropropagación de esta especie, ya que contrario a lo que ocurre en otras geófitas ornamentales la oscuridad no induce el crecimiento de los bulbos en *S. formosissima*.

El incremento de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo hasta 7 y 9 % promovió la acumulación de carbohidratos no estructurales (almidón, azúcares solubles, sacarosa y fructosa) en los bulbos de *S. formosissima*. Esta respuesta fue consistente con la actividad enzimática de AGPasa, SSS y GBSS y actividad enzimática específica de AGPasa y SSS (enzimas implicadas en la síntesis del almidón) que también aumentaron.

El incremento en la concentración de P inhibió la actividad de AGPasa y SSS, por lo que es recomendable mantener su concentración basal en el medio de cultivo MS utilizado para el cultivo de *S. formosissima* en estos ensayos.

Con base en estos resultados se sugiere utilizar una intensidad de luz de 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y una concentración de 7 % de sacarosa en el medio de cultivo MS para promover la acumulación de carbohidratos no estructurales y el crecimiento de los bulbos de *S. formosissima* cultivados *in vitro*.

La temperatura baja y el ABA promueven la latencia de los bulbos de *S. formosissima* cultivados *in vitro*. La exposición de estos órganos a estas condiciones inhibió la formación de hojas y raíces y promovió la degradación de almidón a azúcares solubles (azúcares solubles totales, sacarosa y fructosa) que incrementaron su concentración en los bulbos. El tratamiento con frío o la adición de ABA al medio de cultivo pueden servir de estrategia para inducir latencia en los bulbos de *S. formosissima*, además estos factores preparan al bulbo para la brotación con la acumulación de carbohidratos solubles que sirven como fuente de carbono y energía.

Con 10 °C en oscuridad y 0.1 a 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ABA a 25 °C, los bulbos de *S. formosissima* se mantienen en un estado de latencia, aunque es necesario establecer los tiempos de exposición óptimos a estos factores, que permitan la mayor acumulación de carbohidratos no estructurales y el mayor tamaño de bulbo.

## VII. LITERATURA CITADA COMPLEMENTARIA

- Ascough G. D., J. E. Erwin, J. Van Staden (2008) *In vitro* storage organ formation of ornamental geophytes. *Horticultural Reviews* 34:417-445.
- Bakhshaie M., M. Babalar, M. Mirmasoumi and A. Khalighi (2010) Effects of light, sucrose, and cytokinins on somatic embryogenesis in *Lilium ledebourii* (baker) Bioss. via transverse thin cell-layer cultures of bulblet microscales. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 85(6): 491-496.
- Chang L., Y. M. Xiao, L. F. She and Y. P. Xia (2013) Analysis of gene expression and enzyme activities related to starch metabolism in *Lycoris sprengeri* bulbs of different sizes. *Scientia Horticulturae* 161:118-124.
- De Klerk G. J. (2012) Micropropagation of bulbous crops: Technology and present state. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 6 (Special issue):1-8.
- de Paiva Neto, V. B. and W. C. Otoni (2003). Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: Does it matter? *Scientia Horticulturae* 97(3-4) 193–202.
- Gul J., Z. Zhen, W. Yiru and L Yingmin (2020) Transcriptome analysis of carbohydrate metabolism genes and molecular regulation of sucrose transport gene *LoSUT* on the flowering process of developing oriental hybrid lily 'Sorbonne' bulb". *International Journal of Molecular Sciences* 21(9): 3092. <https://doi.org/10.3390/ijms21093092>
- Guy C., F. Kaplan, J. Kopka, J. Selbig, D. K. Hincha (2008) Metabolomics of temperature stress. *Physiologia Plantarum* 132:220-235. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00999.x>
- Horvath D. (2009) Common mechanisms regulate flowering and dormancy. *Plant Science* 6(177):523-531. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.09.002>
- li K., H. Okubo and T. Matsumoto (2002) Control of bulb dormancy in hyacinth - A molecular biological approach. *Acta Horticulturae*. 570: 241-246.
- Kossmann J. and J. Lloyd (2000) Understanding and influencing starch biochemistry. *Critical Reviews in Plants Science* 19(3):171-226. <http://dx.doi.org/10.1080/07352680091139204>
- Li X., C. Wang, J. Cheng, J. Zhang, J. A. da Silva, X. Liu, X. Duan, T. Li and H. Sun (2014) Transcriptome analysis of carbohydrate metabolism during bulblet

- formation and development in *Lilium davidii* var. unicolor. BMC Plant Biology 14(358). <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0358-4>
- Lytovchenko A. and A. R. Fernie (2002) Carbon assimilation and metabolism in potato leaves deficient in plastidial phosphoglucomutase. Planta 215(5):802-811.
- Miller W. B. and R. W. Langhans (1990) Low temperature alters carbohydrate metabolism in Easter lily bulbs. HortScience 25:463-465. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.25.4.463>
- Moe R. and A. L. F. Wickstrøm (1973) The effect of storage temperature on shoot growth, flowering, and carbohydrate metabolism in tulip bulbs. Physiologia Plantarum 28:81-87. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1973.tb01155.x>
- Pałka, P., M. Cioc, K. Hura, B. Szewczyk-Taranek and B. Pawłowska (2023) Adventitious organogenesis and phytochemical composition of Madonna lily (*Lilium candidum* L.) *in vitro* modeled by different light quality. Plant Cell Tissue Organ Culture 152: 99-114. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02391-5>
- Yasemin S. and M. Beruto (2024) A review on flower bulb micropropagation: challenges and opportunities. Horticulturae 10(3): 1-31. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10030284>
- Xu R. Y., Y. Niimi and D. S. Han (2006) Changes in endogenous abscisic acid and soluble sugars levels during dormancy release in bulbs of *Lilium rubellum*. Scientia Horticulturae 111:68-72.
- Xu J., Q. Li, L. Yang, X. Li, Z. Wang, Z. Yang and Y. Zhang (2020). Changes in starch synthesis and metabolism within developing bulbs of *Lycoris radiata* during the vegetative growth stage. Journal of Plant Growth Regulation 39(2):785-794. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-10022-1>

## APÉNDICE

**Cuadro 1A.** Cuadrados medios del análisis de varianza en la evaluación del crecimiento de *S. formosissima* propagada *in vitro* con diferente intensidad de luz.

Variable	GL		Cuadrados medios		R <sup>2</sup>	CV
	Luz	Error	Luz	Error		
Clorofila a	4	14	0.215**	0.130	0.88	25.92
Clorofila b	4	14	0.016**	0.001	0.82	31.55
Clorofila total	4	14	0.351**	0.022	0.86	26.67
Color	4	30	327.30**	8.680	0.83	17.23
Número de hojas	4	45	1.460*	0.420	0.23	36.46
Longitud de hoja más larga	4	45	3.74 <sup>NS</sup>	16.530	0.01	84.10
Peso fresco de hoja	4	30	319.60 <sup>NS</sup>	2,235.8	0.01	79.48
Peso seco de hoja	4	30	53.82 <sup>NS</sup>	44.570	0.13	85.35
Ancho de bulbo	4	30	0.062*	0.165	0.27	22.02
Largo de bulbo	4	30	0.16 <sup>NS</sup>	1.631	0.09	27.05
Peso fresco de bulbo	4	30	1.97**	0.300	0.46	20.01
Peso seco de bulbo	4	30	9.26**	1.310	0.48	30.55

CV = coeficiente de variación, GL = grados de libertad; R<sup>2</sup> = coeficiente de determinación, NS = diferencia no significativa, \* y \*\* = diferencias significativas a P ≤ 0.05 y P ≤ 0.01, respectivamente. Los datos de las variables clorofila a, clorofila total (z<sup>2</sup>), color [exp(z)], longitud de hoja más larga [log(z+1)], peso fresco [ $\{z+\sqrt{(z+1)}\}$ ] y seco ( $\sqrt{z}$ ) de bulbo se transformaron para realizar el análisis de varianza.

**Cuadro 2A.** Cuadrados medios del análisis de varianza para la concentración enzimática y tiempo de incubación sobre la concentración de almidón en bulbos de *S. formosissima* propagados *in vitro*.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrados medios</b>
Bulbos	1	2654.81 <sup>**</sup>
Concentración de enzimas (E)	1	2405.10 <sup>*</sup>
Tiempo de incubación (T)	2	3795.34 <sup>**</sup>
Interacción E*T	2	570.40 <sup>NS</sup>
Error	28	485.50
Total	34	

R<sup>2</sup>= 0.74; CV= 21.40. NS = diferencia no significativa, \* y \*\* = diferencias significativas a P ≤ 0.05 y P ≤ 0.01, respectivamente.

**Cuadro 3A.** Cuadrados medios del análisis de varianza de la concentración de carbohidratos no estructurales por efecto de la intensidad de luz en plántulas de *S. formosissima* propagadas *in vitro*.

Variable	GL		Cuadrados medios		R <sup>2</sup>	CV
	Luz	Error	Luz	Error		
<b>Bulbos</b>						
Azúcares solubles totales	4	15	0.126 <sup>NS</sup>	0.077	0.30	4.99
Fructosa total	4	15	1066.03 <sup>NS</sup>	569.84	0.33	34.15
Sacarosa	4	14	247.23*	50.23	0.58	25.29
Azúcares reductores	4	15	0.00008 <sup>NS</sup>	0.0001	0.18	26.22
Almidón	4	14	740.67*	180.76	0.53	32.28
<b>Hojas</b>						
Azúcares solubles totales	4	14	534.53 <sup>NS</sup>	1507.39	0.09	35.17
Fructosa total	4	14	414.21 <sup>NS</sup>	398.18	0.22	56.65
Sacarosa	4	11	0.00022 <sup>NS</sup>	0.0001	0.32	39.68
Azúcares reductores	4	14	64.89 <sup>NS</sup>	135.74	0.12	42.22

CV = coeficiente de variación, GL = grados de libertad; R<sup>2</sup> = coeficiente de determinación, NS = diferencia no significativa, \* y \*\* = diferencias significativas a P ≤ 0.05 y P ≤ 0.01, respectivamente. Los datos de las variables fructosa, azúcares solubles totales en bulbo [ $\log \{z + \sqrt{(z^2 + 1)}\}$ ], azúcares reductores en hojas y bulbos (1/z) se transformaron para realizar el análisis de varianza.

**Cuadro 4A.** Cuadrados medios del análisis de varianza por rangos para el efecto de tratamientos con ABA y temperatura baja sobre el número de hojas en bulbos de *S. formosissima* cultivada *in vitro*.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrados medios</b>
Tratamientos	7	2169.02**
Error	72	202.87
Total	79	
R <sup>2</sup>	0.50	
CV	35.16	

CV = coeficiente de variación, R<sup>2</sup> = coeficiente de determinación, <sup>NS</sup> = diferencia no significativa, \* y \*\* = diferencias significativas a P ≤ 0.05 y P ≤ 0.01, respectivamente.

**Cuadro 5A.** Cuadrados medios del análisis de varianza por rangos para el efecto de tratamientos con ABA y temperatura baja sobre la longitud de raíz más larga en bulbos de *S. formosissima* cultivada *in vitro*.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrados medios</b>
Tratamientos	7	20.78**
Error	35	3.39
Total	42	
R <sup>2</sup>	0.55	
CV	77.49	

CV = coeficiente de variación, R<sup>2</sup> = coeficiente de determinación, <sup>NS</sup> = diferencia no significativa, \* y \*\* = diferencias significativas a P ≤ 0.05 y P ≤ 0.01, respectivamente.

Texcoco, Estado de México, 12 de junio de 2024  
Núm. Ref.: 3511-23

**Dra. Martha Elena Pedraza-Santos**  
**Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**  
**Presente**

Por medio de la presente se hace constar que el manuscrito titulado **La luz promueve la bulbificación *in vitro* de *Sprekelia formosissima***, del cual son autores (as): **Agustín Uribe-Treviño, Martha Elena Pedraza-Santos, Patricia Delgado-Valerio, Alejandro Martínez-Palacios, Juan Carlos González-Hernández y Pedro Antonio-López**, fue aceptado para ser publicado en el volumen 15(7)2024, en la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

**Atentamente**

JSAPIhPWpRZ6tXw+VhUyyg==EN0Xfy6BnNRYwviTqOd3FD5IFPo=

**Dra. Dora Ma. Sangerman-Jarquín**  
**Editora en Jefa de la Revista**  
**Mexicana de Ciencias Agrícolas**

## ARTÍCULO

### Plantas geófitas de México con potencial ornamental

Agustín Uribe Treviño y Martha Elena Pedraza Santos



<https://pixabay.com/es/photos/cebollas-bulbos-de-tulip%C3%A1n-tulipanes-4936235/>

**Agustín Uribe Treviño.** Es estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, Opción Conservación y Manejo de Recursos Naturales, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

[uribe\\_ta@hotmail.com](mailto:uribe_ta@hotmail.com)

**Martha Elena Pedraza Santos.** Profesora-Investigadora de la Facultad de Agrobiología «Presidente Juárez», Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

[martha.elena.pedraza@umich.mx](mailto:martha.elena.pedraza@umich.mx)

#### Plantas geófitas en el mercado mundial de flores

**E**l mercado florícola mundial comercializa más de 800 géneros de geófitas ornamentales como flor de corte, planta en maceta, en paisajismo y jardinería. Las especies más conocidas e importantes económicamente son tulipán, lili, gladiola, narciso, iris, jacinto y crocus. Las geófitas han evolucionado para sobrevivir en ambientes adversos a través de la producción de órganos subterráneos de reserva, como rizomas, tubérculos, cormos o bulbos que les permiten mantener un estado de reposo. Estos órganos almacenan agua y carbohidratos que suministran energía y permiten