



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**EFFECTO DEL TIPO DE EXPLANTE AÉREO EN LA REGENERACIÓN
IN VITRO DE *Alstroemeria* spp.**

Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo y al Grado de
Magíster en Ciencias Agropecuarias, Mención Producción de Cultivos

CAMILA GUZMÁN GONZÁLEZ

Director de Tesis
DANILO AROS ORELLANA

Profesores Consejeros
RODRIGO INFANTE ESPIÑEIRA
LORETO PRAT DEL RIO

SANTIAGO - CHILE
2015

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

EFECTO DEL TIPO DE EXPLANTE AÉREO EN LA REGENERACIÓN IN VITRO DE
Alstroemeria spp.

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo y al Grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias, Mención Producción de Cultivos.

CAMILA GUZMÁN GONZÁLEZ

	Calificaciones (Memoria de Título)	Calificaciones (Tesis de Grado)
DIRECTOR DE TESIS		
Danilo Aros Orellana Ingeniero Agrónomo, Ph.D.	7,0	Aprobada
PROFESORES CONSEJEROS		
Rodrigo Infante Espiñeira Ingeniero Agrónomo, Dr.	6,3	Aprobada
Loreto Prat del Rio Ingeniero Agrónomo, Mg. Sc., Dra.	7,0	Aprobada

Santiago, Chile
2015

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Durante el periodo en que desarrollé esta investigación, muchas personas me brindaron su apoyo, compromiso y paciencia, y es por esto que forman parte de este largo proceso. A todos ellos quiero dedicarles mi tesis, el cierre de una etapa con altos y bajos, y el inicio de una nueva vida.

Quiero agradecer a Edgardo Vargas, Manuel Cáceres, Salomé Campos, Luis Rivera, Paulina Barraza y María José Olguín, amigos que conocí en la universidad y que, con cada uno de sus gestos, se volvieron parte de mi vida. Sumo a mis buenas amigas Nicole Rivera y Javiera Candia, su compañía ayudó a superar todas las barreras.

Agradezco a los profesores Danilo Aros, Loreto Prat y Américo Contreras, por compartir sus conocimientos y brindarme su comprensión.

Finalmente, mis agradecimientos a “Proyecto U-INICIA VID 2012” por proporcionar los fondos necesarios para el desarrollo de la presente Tesis de Grado, y por cubrir los gastos generados durante mis estudios en el programa de Magíster en Ciencias Agropecuarias, mención Producción de Cultivos, de la Universidad de Chile.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO I: Técnicas de micropropagación en <i>Alstroemeria</i> spp.	1
Género <i>Alstroemeria</i>	2
Descripción general del cultivo in vitro	2
Medio de cultivo	3
Reguladores de crecimiento	4
Regeneración in vitro de <i>Alstroemeria</i> spp.	4
Regeneración directa	5
Explantes	6
Desinfección	7
Medios nutritivos	7
Condiciones del cultivo	8
Regeneración indirecta	8
Explantes	9
Medios nutritivos	10
Condiciones del cultivo	10
Efecto del genotipo en regeneración in vitro de <i>Alstroemeria</i> spp.	11
Literatura citada	12
CAPÍTULO II: Efecto del tipo de explante aéreo en la regeneración in vitro de <i>Alstroemeria</i> spp.	16
Resumen	17
Abstract	18
Introducción	19
Hipótesis	21
Objetivo general	21
Objetivos específicos	21
Materiales y métodos	22
Ubicación del estudio	22
Material vegetal	22
Desinfección de explantes	23
Etapa 1: medio de inducción	23
Estudio histológico	25
Etapa 2: medio de regeneración	25
Evaluación de efectividad	25
Evaluación de eficiencia	26

Análisis estadístico	26
Resultados y discusión	27
Desinfección de explantes	27
Efectividad	27
Análisis histológico	35
Eficiencia	36
Conclusiones	45
Literatura citada	46

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	24
Cuadro 2	29
Cuadro 3	30
Cuadro 4	31
Cuadro 5	32
Cuadro 6	40
Cuadro 7	40
Cuadro 8	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	6
Figura 2	9
Figura 3	22
Figura 4	23
Figura 5	24
Figura 6	28
Figura 7	32
Figura 8	33
Figura 9	34
Figura 10	35
Figura 11	37
Figura 12	38

Figura 13	39
Figura 14	41
Figura 15	43

ANEXOS

Anexo 1: medio basal Murashige y Skoog	49
Anexo 2: preparación de muestras histológicas	50

APÉNDICES

Apéndice 1: ensayo previo de desinfección de explantes	52
Apéndice 2: preparación de medios para cultivo in vitro	54
Apéndice 3: protocolo de regeneración in vitro para <i>Alstroemeria</i> spp. (<i>A. caryophyllaea</i> y <i>A. 'Sweet Laura'</i>) a partir de explantes aéreos	55

CAPÍTULO I

TÉCNICAS DE MICROPROPAGACIÓN EN *Alstroemeria* spp.

GÉNERO *Alstroemeria*

El género *Alstroemeria* se encuentra en América del Sur, abarcando desde Venezuela hasta Tierra del Fuego y la zona este de Brasil (Muñoz y Moreira, 2003; Chacón *et al.*, 2012). Lo componen plantas perennes, que poseen rizomas e inflorescencias terminales (Bayer, 1987; Muñoz y Moreira, 2003). El interés por cultivar estas especies ha incrementado con el mejoramiento genético realizado, enfocado principalmente en el tamaño y color de sus flores, permitiendo el desarrollo de cultivares valorados en todo el mundo para su uso como flor de corte y maceta (Hoshino, 2008). Tradicionalmente, se han propagado vegetativamente a través de rizomas obtenidos desde plantas cultivadas en invernadero, pero es un método que presenta baja tasa de multiplicación (Lin *et al.*, 1997) y provoca la dispersión de virus (Van Zaayen, 1995). Actualmente se utiliza la propagación *in vitro*, técnica que permite producir rápidamente gran cantidad de plantas (Khaleghi *et al.*, 2008), las cuales, al aplicar en conjunto otras técnicas, pueden llegar a estar libres de enfermedades (Buitendijk *et al.*, 1992).

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL CULTIVO IN VITRO

La técnica de cultivo *in vitro*, o micropropagación, consiste en producir plantas a partir de un explante (células, tejidos u órganos) adquirido desde una planta madre, seleccionada por algún carácter de interés que sea deseable mantener. Dicho explante debe pasar por una etapa de desinfección que permita eliminar microorganismos contaminantes. Con posterioridad, es cultivado en medios contenidos en recipientes, manteniendo la asepsia y controlando las condiciones de ambiente y nutrición (Hartmann y Kester, 1999; George *et al.*, 2008). La regeneración de una plántula se puede lograr de manera directa a partir del explante seleccionado (Hartmann y Kester, 1999), o de manera indirecta a partir de callos, formados por proliferación celular en meristemas activos presentes en el explante, que poseen potencial para desarrollar raíces, brotes y/o embriones, que posteriormente formarán plántulas (Hoshino, 2008). Se debe tener presente que este último tipo de regeneración eventualmente puede desarrollar variabilidad genética, por lo que no debe considerarse en propagación clonal de cultivares (Hartmann y Kester, 1999).

Se han propuesto una secuencia de pasos para desarrollar la técnica de cultivo *in vitro*, y aunque no es necesario seguir la continuidad de éstos, es importante su conocimiento para obtener óptimos resultados. En la fase 0 se selecciona y prepara la planta madre, la cual debe estar sana y en activo crecimiento para facilitar la obtención y selección del explante.

El tamaño del explante puede variar desde 1 a 5 mm de longitud en brotes apicales, hasta trozos de tallos de varios centímetros de largo. También se considera el uso de secciones nodales que contengan una yema lateral, trozos de hojas con nervaduras, escamas de bulbos, escapos florales y cotiledones (Hartmann y Kester, 1999). Por otra parte, para un óptimo procedimiento, es importante realizar una desinfección adecuada a los explantes antes de iniciar el cultivo. Los métodos más utilizados corresponden a la inmersión en soluciones de hipoclorito de sodio o etanol, en diversas concentraciones y distinta duración dependiendo el tipo de explante (George *et al.*, 2008). La fase I consta de la preparación del medio de cultivo en el que se desarrollará el explante. Dicho medio se debe autoclavar a 121°C por 20 minutos para asegurar la asepsia (Pedraza-Santos *et al.*, 2006; Khaleghi *et al.*, 2008; Pumisitapon *et al.*, 2011). En la fase II se multiplican y enraízan los propágulos mediante el establecimiento del explante en el medio de cultivo, para inducir su crecimiento y desarrollo (Hartmann y Kester, 1999), generando un rápido aumento de órganos y/o estructuras a través del desarrollo de brotes axilares y terminales, inducción de brotes adventicios, o embriogénesis somática (Sagawa and Kunisaki, 1990). Para mantener la asepsia de los explantes, la transferencia se debe realizar en una campana de flujo laminar que posea un filtro de alta eficiencia para eliminar partículas presentes en el aire (Hartmann y Kester, 1999). Según Sagawa y Kunisaki (1990), el enraizamiento del explante permite la preparación de la plántula para su transferencia y establecimiento al medio natural, desarrollando un proceso de transformación en el que pasan de ser heterótrofas a ser consideradas como autótrofas, es por esta razón que el medio utilizado es en general sin aplicación de reguladores de crecimiento (George *et al.*, 2008). La fase III es el proceso de aclimatación, mediante el traspaso de las plántulas enraizadas a macetas con sustrato esterilizado, como turba, perlita, arena y vermiculita, o mezcla de éstos, manteniendo una condición de alta humedad y baja intensidad de luz los primeros días, en condiciones de cámara de crecimiento, y una posterior disminución de la humedad y aumento de la intensidad lumínica, en condiciones de invernadero, para evitar la deshidratación (Sagawa and Kunisaki, 1990; Hartmann y Kester, 1999; George *et al.*, 2008). En la fase IV, se transfieren las plantas estabilizadas en maceta a un ambiente natural *ex vitro*. Los factores medioambientales y relacionados a nutrición aseguran el éxito total de la propagación, por lo tanto se deben brindar las condiciones de sustrato, nutrientes, riego y calidad de luz necesarios para que la planta logre finalizar su desarrollo de manera óptima (Hartmann y Kester, 1999; George *et al.*, 2008).

Medio de Cultivo

El medio nutritivo a utilizar va a depender del tipo de explante que se seleccione y de la etapa de propagación en que se encuentre. Uno de los elementos necesarios en un medio de cultivo son las sales inorgánicas, que específicamente corresponden a macro y micro

elementos, requeridos de manera básica por las especies vegetales para su desarrollo y crecimiento (Hartmann y Kester, 1999; George *et al.*, 2008). Por ello se utiliza el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), que posee las sales necesarias para el cultivo de una amplia variedad de plantas herbáceas. También se encuentran los compuestos orgánicos, como carbohidratos y vitaminas; y los sostenes inertes, como el agar, que es un producto en polvo, biológicamente inerte, obtenido de ciertas especies de algas rojas, y que posee la propiedad de mantenerse como gel semisólido a temperatura ambiente, aunque se logra su derretimiento al aplicar calor (Hartmann y Kester, 1999). Este último, se ve afectado por la concentración, la que se recomienda entre 0,5 y 0,6 % para lograr un buen contacto con la planta y permitir el adecuado aprovechamiento de nutrientes, y por el pH, que debe ajustarse entre 5,0 y 6,0. Para el caso de un medio de cultivo no gelificado de igual manera se requiere algún tipo de sostén para mantener fijo al explante, los que generalmente corresponden a puentes de papel filtro (Pedraza-Santos *et al.*, 2006; Hoshino, 2008).

Reguladores de Crecimiento

El desarrollo del explante se logra regulando las concentraciones de auxinas, que estimulan elongación celular, y de citoquininas, que promueven división celular, disminuyen dominancia apical y fomentan la formación de callos, en presencia de auxinas (Hartmann y Kester, 1999; Azcón-Bieto y Talón, 2008). Para el caso de auxinas, comúnmente se utiliza ácido naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (AIB) en concentraciones de 0,1 a 10 mg L⁻¹ y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en concentraciones de 0,05 a 0,5 mg L⁻¹, mientras que para el caso de citoquininas, se incluyen 6-bencilaminopurina (BAP) y Kinetina (KIN), en concentraciones de 0,1 a 10 mg L⁻¹ (Ongaro and Leyser, 2008; Hutchinson *et al.*, 2010; Pumisitapon *et al.*, 2011; Seyedyousefi *et al.*, 2013).

REGENERACIÓN IN VITRO DE *Alstroemeria* spp.

Se ha establecido a través de diversos estudios que el genotipo de la especie a propagar afecta el desarrollo de la técnica de micropropagación, demostrando que no todos los cultivares de alstroemeria desarrollan igual regeneración ni obtienen la misma tasa de propagación (Buitendijk *et al.*, 1992; Lu and Bridgen, 1996; Hoshino, 2008), aunque al utilizar el mismo tejido se ha observado un comportamiento de regeneración similar entre distintos genotipos (Chiari and Bridgen, 2000; Pumisitapon *et al.*, 2011).

Diversos autores han definido protocolos para obtener óptimos resultados en cultivo in vitro de *Alstroemeria* spp. El medio de cultivo básico utilizado es MS (Murashige and Skoog, 1962), el cual posee macro y microelementos, además de vitaminas necesarias para el desarrollo de los explantes. Se puede utilizar un medio de cultivo semisólido, gelificado con agar u otros agentes, o líquido, al cual se adiciona sacarosa como carbohidrato de rápida absorción, y reguladores de crecimiento vegetal (Hoshino, 2008). Dentro de los reguladores de crecimiento más utilizados en cultivo in vitro de *Alstroemeria* spp. se encuentran las citoquininas, tales como 6-bencilaminopurina (BAP) y tidiazurón (TDZ), capaces de estimular la división celular en presencia de auxinas; y las auxinas, implicadas en procesos de división, crecimiento y diferenciación de las células, tales como ácido indol-3-butírico (AIB), ácido α -naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Azcón-Bieto y Talón, 2008; Ongaro and Leyser, 2008). Dichas hormonas se emplean en diferentes concentraciones y combinaciones, dependiendo del tipo de explante utilizado y el objetivo final a conseguir. Investigaciones basadas en *Alstroemeria aurantiaca* 'Rosita', realizadas por Hutchinson *et al.* (2010), señalan que la adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo aumentan significativamente el número y longitud de brotes, como también el número de hojas formadas. Pumisitapon *et al.* (2011), examinaron la actividad de varios reguladores de crecimiento en dos cultivares de *Alstroemeria*, '24098' y 'Sara', comprobando que el rol de las auxinas en alstroemeria es inhibir el crecimiento de la yema axilar, y que por el contrario las citoquininas, específicamente BAP y TDZ, promueven el crecimiento de la yema axilar secundaria. En tanto que Seyedyousefi *et al.* (2013), a partir de la evaluación sobre organogénesis en *Alstroemeria* 'Fuego', indican que es necesario baja concentración de ANA (hasta 0.2 mg L^{-1}) para el crecimiento de brotes, y que aumentos en la concentración de BAP (mayor a 1.5 mg L^{-1}) disminuye la longitud de brotes.

Regeneración Directa

Este método de regeneración implica el desarrollo de brotes axilares y/o adventicios directamente a partir del explante utilizado, tanto para el caso de rizomas como del tipo aéreo (Chu and Kurtz, 1990). Existe evidencia sobre la factibilidad de desarrollar nuevos brotes, directamente a partir de rizomas utilizados como explantes (Yousef *et al.*, 2007; Khaleghi *et al.*, 2008), mientras se considera que en monocotiledóneas, como es el caso de alstroemeria, no es posible lograr la regeneración de plántulas a partir de explantes aéreos tales como hojas y tallos (Hoshino, 2008), por ello resulta interesante estudiar el cultivo in vitro de tejidos aéreos en estas especies. Lin *et al.* (1997), desarrollan un protocolo único en micropropagación de alstroemeria, utilizando hojas como explantes, y con posterioridad, Pedraza-Santos *et al.* (2006), logran regenerar plántulas de manera directa a partir de inflorescencias inmaduras. Más tarde, Nasri *et al.* (2013) lograron regenerar brotes

adventicios directamente a partir del área ubicada entre la base foliar y el tejido del tallo de un híbrido de *Alstroemeria ligtu*.

Explantos

Existen diversos estudios en los que se ha empleado rizomas, inflorescencias, brotes, hojas, y/o secciones de tallos como trozos vegetativos para propagar alstroemeria (Lin *et al.*, 1997; Pedraza-Santos *et al.*, 2006; Nasri *et al.*, 2013). Utilizando ápices de rizomas de *Alstroemeria* 'Jamaica', Yousef *et al.* (2007), sostienen que explantes obtenidos desde in vivo demuestran mayor prolificidad, al desarrollar mayor número de brotes, raíces y rizomas, en comparación a explantes obtenidos desde in vitro, sin embargo desarrollan altos niveles de contaminación. Chiari and Bridgen (2000), señalan que al seccionar los rizomas de manera vertical se logra aumentar el rendimiento de propagación, en comparación con mantener el rizoma intacto o realizar una división horizontal, aunque estos últimos permiten una mayor proliferación de brotes. Por su parte Khaleghi *et al.* (2008), especifican que es posible utilizar rizomas obtenidos desde in vivo aplicando una laboriosa desinfección, utilizando zonas apicales y/o axilares de 4 a 6 mm de longitud, seccionados con posterioridad a la desinfección. En contraste Pedraza-Santos *et al.* (2006), recomiendan utilizar explantes aéreos, tales como secciones de hojas (1 cm²), ápices de tallo (1 cm de longitud) conteniendo un trozo de peciolo (fase vegetativa) y ápices de inflorescencias inmaduras (1,5 cm de longitud). Frente a las bajas tasas de multiplicación y alto riesgo de diseminar enfermedades al usar rizomas como explantes, Lin *et al.* (1997) utilizan las cinco hojas superiores del brote, completamente desarrolladas. Los explantes que se obtienen desde el extremo más cercano al ápice del tallo muestran mayor porcentaje de regeneración de brotes, y mayor número de brotes por explante regenerado (Lin *et al.*, 1998). Lin *et al.* (1997), señalan que el método de corte del explante influye en la regeneración de brotes, y detallan que este debe ser a través de la porción nodal (Figura 1). Por su parte, Nasri *et al.* (2013) proponen como explante inicial el uso de las 2 primeras hojas de la especie vegetal, en estado de plántula, conteniendo 1 cm de longitud de su base.

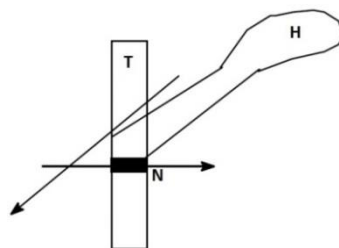


Figura 1. Método de corte para cultivo in vitro de hojas de *Alstroemeria* spp. utilizadas como explantes (Las flechas indican zona y dirección de corte; T: tallo, H: hoja, N: nudo). Modificado de Lin *et al.* (1997).

A partir de estudios histológicos, Lin *et al.* (1998), demuestran que las hojas son explantes útiles para iniciar el desarrollo in vitro de monocotiledóneas, desarrollando regeneración directa a partir de yemas adventicias (no observan primordios de yemas ni yemas axilares), inducidas a partir de células epidérmicas individuales del tejido axilar de la hoja.

Desinfección

Para cultivar in vitro un rizoma proveniente desde in vivo, se debe realizar una desinfección laboriosa. Por ello se plantea un primer lavado del explante (3 cm de longitud) con agua en circulación durante 10 minutos, luego realizar la inmersión del explante en 40% (v/v) de cloro comercial (5,54% hipoclorito de sodio) durante 35 minutos, y finalmente aplicar tres enjuagues con agua destilada estéril de 3, 5 y 10 minutos de duración, respectivamente (Yousef *et al.*, 2007). Por su parte Khaleghi *et al.* (2008), señalan como esterilización para rizomas una primera inmersión en etanol (70%) durante 30 segundos, luego transferir a una solución con hipoclorito de sodio (2 %) durante 30 minutos, y finalmente enjuagar 3 veces con agua destilada estéril. Por otra parte, Pedraza-Santos *et al.* (2006) prueban que la inmersión de los explantes aéreos (hojas, tallos e inflorescencias) en 20% (v/v) de hipoclorito de sodio comercial (6% cloro) durante 20 minutos, y posteriormente 5 enjuagues con agua destilada estéril, proporciona las menores tasas de contaminación (5-10%). Además, estos autores indican que la aplicación del mismo tratamiento desinfectante en rizomas utilizados como explantes, no proporciona resultados positivos ya que se obtienen altas tasas de contaminación ($\geq 60\%$), y por lo tanto lo descartan como material para micropropagación.

Medios nutritivos

Estudios en micropropagación de alstroemeria mediante rizomas, proponen su cultivo en medio MS (Murashige and Skoog, 1962), con sales basales y vitaminas, complementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa y gelificado con 2 o 3 g L⁻¹ de gelrite, con 2,5 g L⁻¹ de phytigel, o con 8 g L⁻¹ de agar, ajustando el pH del medio de cultivo en $5,7 \pm 1$. Este medio es también suplementado con 2 mg L⁻¹ de BAP y/o con 0,02 mg L⁻¹ de ANA (Kristiansen *et al.*, 1999; Chiari and Bridgen, 2000; Yousef *et al.*, 2007) con el objetivo de generar brotes, raíces y rizomas, aunque para aumentar su proliferación se propone suplementar el medio con 1 mg L⁻¹ de BAP y 0,2 mg L⁻¹ de ANA (Yousef *et al.*, 2007).

Al seleccionar hojas como explantes para micropropagación de alstroemeria, Lin *et al.* (1997) señalan que se deben iniciar en un medio de inducción durante 10 días, que contenga medio MS (Murashige and Skoog, 1962), suplementado con 1,5 mg L⁻¹ de TDZ y 0,1 mg L⁻¹ de AIB, 30 g L⁻¹ de sacarosa, y gelificado con 7,4 g L⁻¹ de Daishin agar,

ajustando el pH del medio de cultivo en 5,8. También se han observado buenos resultados utilizando una concentración de 2,2 mg L⁻¹ de TDZ, gelificando el medio con 7,5 g L⁻¹ de microagar (Lin *et al.*, 1998, Kim *et al.*, 2006). Con posterioridad al medio de inducción, Kim *et al.* (2006), señalan que los explantes deben ser transferidos a un medio de regeneración que contenga MS (Murashige and Skoog, 1962), suplementado con 0,5 mg L⁻¹ de BAP, 30 g L⁻¹ de sacarosa, y gelificado con 7 g L⁻¹ de microagar. Para el caso específico de regeneración de alstroemeria a partir de inflorescencias maduras utilizadas como explantes, Pedraza-Santos *et al.* (2006), recomiendan el uso de un medio gelificado que contenga MS (Murashige and Skoog, 1962), con sales basales y vitaminas, suplementado con 2,5 mg L⁻¹ de KIN y 1,5 mg L⁻¹ de BAP. Pedraza-Santos *et al.* (2006), observan un aumento en la proliferación de brotes adventicios al cultivar los explantes aéreos en medio líquido, sobre un trozo de papel filtro, suplementado con 1 mg L⁻¹ de ANA, 2,5 mg L⁻¹ de KIN y 1,5 mg L⁻¹ de BAP. Nasri *et al.* (2013), indican que un incremento en la concentración de BAP entre 0 y 1 mg L⁻¹ provoca un aumento en el número de brotes y yemas, pero un mayor incremento en la concentración reduce el número de brotes, agregando que una concentración de 0,2 mg L⁻¹ de AIB suprime la formación de brotes.

Condiciones del cultivo

El cultivo *in vitro* de rizomas requiere un fotoperiodo de 16 horas de luz, y temperatura de 18°C (Kristiansen *et al.*, 1999; Chiari and Bridgen, 2000; Yousef *et al.*, 2007). Para el caso específico de regeneración a partir de hojas, se sugiere mantener el cultivo en oscuridad, ajustando la temperatura en 18°C (Lin *et al.*, 1997). En tanto que Pedraza-Santos *et al.* (2006), sugieren mantener durante los primeros 15 días en condiciones de oscuridad a 8°C, y posteriormente con 16 horas de luz y 25°C. Durante la etapa de multiplicación, Kim *et al.* (2006), plantean que el cultivo se debe mantener a 18°C y con 16 horas de luz.

Regeneración Indirecta

Este sistema de regeneración implica un periodo independiente en el que ocurre desarrollo de callos, correspondiente a masas de células que potencialmente pueden desarrollar meristemas, órganos y/o embriones, dependiendo de las condiciones específicas en que se desarrolle el cultivo. Es importante señalar que este tipo de regeneración posee potencial para desarrollar variabilidad genética, por lo que no debe considerarse en propagación clonal de cultivares (Hartmann and Kester, 1999), y por esta misma razón se ha utilizado para inducir variabilidad, implementándose en metodologías para la transformación genética de esta especie (Akutsu and Sato, 2002).

Esencialmente, se obtiene desarrollo de callos por la interacción entre reguladores de crecimiento, al estar en directo contacto con lesiones producidas en estructuras vegetales tales como hojas, tallos, raíces, semillas y/o frutos (Hartmann y Kester, 1999). En monocotiledóneas, generalmente, se desarrollan dos tipos de callos embriogénicos, conocidos como compactos y friables, y su formación dependerá del medio nutritivo en el que se cultive el explante, principalmente de los reguladores de crecimiento suplementados (Lin *et al.*, 2000). Lin *et al.* (2000), señalan al sistema de callos embriogénicos en monocotiledóneas como el mejor método para regenerar tejidos, principalmente porque éste permite proveer de grandes cantidades de material que es posible mantener por más de un año y medio sin perder su capacidad de regenerar plántulas (Figura 2).

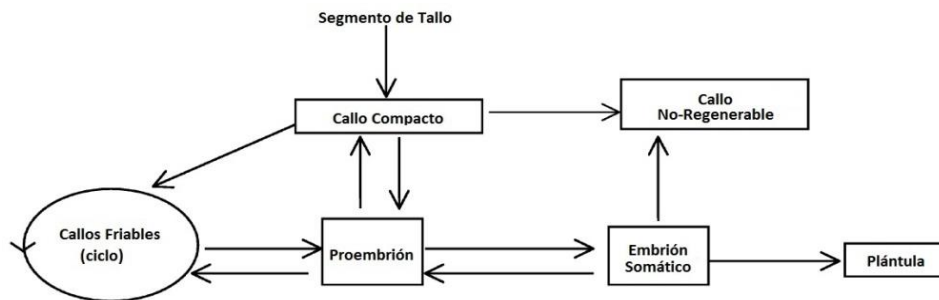


Figura 2. Regeneración de plántulas mediante el proceso de embriogénesis somática en *Astroemeria* spp. Modificado de Lin *et al.* (2000).

Explantos

En brotes y porciones de hojas (base y pedicelos) se encuentran células predeterminadas embriogénicamente que frente a un estímulo, como el causado por reguladores de crecimiento, tienden a desarrollar embriogénesis somática (Cruz *et al.*, 2003). A partir de segmentos de tallo (1 cm longitud) se forman callos compactos, a los que se induce el desarrollo de callos friables, para lograr la posterior formación de proembriones que permitan regenerar una plántula (Lin *et al.*, 2000). Kim *et al.* (2001) plantean la regeneración de plántulas mediante embriones somáticos, utilizando como explantes iniciales tejidos de anteras, ovarios y óvulos, y secciones de nudos y entrenudos. Pedraza-Santos *et al.* (2006), señalan que al utilizar secciones de hojas y/o tallos como explantes aéreos, es posible desarrollar callos, a partir de los que se regeneran plántulas. Por su parte, Kim *et al.* (2006), lograron desarrollar embriogénesis somática a partir de callos embriogénicos, compactos y friables, iniciados desde secciones de nudos con tejido axilar.

Medios nutritivos

Para inducir el desarrollo de callos a partir de secciones de tallo, Lin *et al.* (2000) utilizan un medio de cultivo conteniendo MS (Murashige and Skoog, 1962), con sales basales y vitaminas, suplementado con 2,4-D en concentraciones de 4 mg L⁻¹, con 0,5 o 1 mg L⁻¹ de BAP, además de 30 g L⁻¹ de sacarosa, gelificado con 7 g L⁻¹ de micro agar, y ajustando el pH del medio en 5,8. Realizan subcultivos a un segundo medio de inducción con MS (Murashige and Skoog, 1962), con sales basales y vitaminas, suplementado con 0,5 mg L⁻¹ de BAP, 30 g L⁻¹ de sacarosa, gelificado con 3 g L⁻¹ de gelrite.

Para Hutchinson *et al.* (1994), la regeneración inicial a partir de callos se logra en un medio que contenga 4,3 mg L⁻¹ de KIN y 3,7 mg L⁻¹ de ANA, y posteriormente, en ausencia de reguladores de crecimiento, se logra la regeneración total de la plántula, a través de embriogénesis somática. Van Schaik *et al.* (1996), señalan que la regeneración a partir de callos se debe realizar en un medio de cultivo con MS (Murashige and Skoog, 1962), con sales basales y vitaminas, suplementado con 400 mg L⁻¹ de caseína hidrolizada, 2 mg L⁻¹ de BAP, 30 g L⁻¹ de sacarosa, gelificado con 2 g L⁻¹ de gelrite, y ajustando el pH en 6,0.

Condiciones del cultivo

El largo del día influye en la capacidad fotosintética de la planta, pero para el caso de organogénesis es difícil describir el efecto del fotoperiodo por el hecho de ser desarrollado en oscuridad, en tanto que la temperatura influencia efectos de crecimiento y desarrollo en la planta (Read, 1990). Para la inducción de callos, los cultivos se deben mantener a una temperatura de 25°C en total oscuridad durante 4 semanas, y para la posterior regeneración a partir de callos los cultivos se deben mantener a 25°C y 16 horas de luz (Hutchinson *et al.*, 1994). Por su parte, Van Schaik *et al.* (1996), señalan que la inducción de callos se logra manteniendo el cultivo en oscuridad con 21°C y agregan que la regeneración se debe realizar con 12 horas de luz, a 18°C. En tanto, Kim *et al.* (2006) detallan que la inducción de callos se logra en total oscuridad y la posterior regeneración de embriones somáticos y/o plántulas se logra con fotoperiodo de 16 horas de luz, para ambos casos a una temperatura de 18°C. Para la inducción de embriones somáticos, los cultivos se deben mantener en oscuridad a 18°C, y la posterior regeneración de plántulas se logra manteniéndolas en 16 horas de luz, a 18°C (Kim *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006).

EFFECTO DEL GENOTIPO EN REGENERACIÓN IN VITRO DE *Alstroemeria* spp.

Se ha establecido a través de diversos estudios que el genotipo de la especie a propagar afecta el desarrollo de la técnica de micropropagación, demostrando que no todos los cultivares desarrollan igual regeneración ni obtienen la misma tasa de propagación (Buitendijk *et al.*, 1992; Lu and Bridgen, 1996; Hoshino, 2008).

Estudios realizados por Podwyszynska *et al.* (1997) en *Alstroemeria* x *Hybrida* 'Juanita', señalan que al aplicar 6 mg L⁻¹ de BAP se logra gran desarrollo de brotes aéreos pero de corta longitud, afectando el enraizamiento, y que al aplicar 1,5 mg L⁻¹ BAP, combinado con KIN o 2ip, se estimula fuertemente la brotación aérea, aunque se forman brotes delgados y de corta longitud. Hutchinson *et al.* (2010), al evaluar las respuestas morfológicas en *Alstroemeria aurantiaca* cv. Rosita, observan que la adición de reguladores de crecimiento al medio de inducción influencia significativamente el número y longitud de brotes, como también el número de hojas formadas, y señalan como concentraciones óptimas, para aumentar número y longitud, aplicaciones entre 0,4 y 1 mg L⁻¹ de TDZ en combinación con 0,1 mg L⁻¹ de ANA. Según Yousef *et al.* (2007), *Alstroemeria* 'Jamaica' logra una mayor proliferación cuando se usa como explantes rizomas obtenidos desde *in vivo*, mediante la interacción entre ANA (0,2 mg L⁻¹) y BAP (1 mg L⁻¹), pero requiriendo una mayor dedicación en la desinfección del explante. Khaleghi *et al.* (2008) obtienen resultados similares con estudios desarrollados en *Alstroemeria* 'Fuego', aunque al variar la concentración de BAP a 0,5 mg L⁻¹ obtienen mayor desarrollo de rizomas. Mientras que Seyedyousefi *et al.* (2013), utilizando la misma variedad, y empleando yemas apicales y laterales de rizomas, obtienen el mayor desarrollo en número y longitud de brotes al aplicar 1 mg L⁻¹ de ANA. Con la investigación en *Alstroemeria* 'Yellow King' realizada por Pedraza-Santos *et al.* (2006), se determinó una adecuada micropropagación al usar ápices de inflorescencias inmaduras obtenidos desde *in vivo*, logrando la mayor proliferación de brotes al suplementar el cultivo con 2,5 mg L⁻¹ de KIN y 0,5 mg L⁻¹ de BAP, aunque considerando cierto desarrollo de callos. Por su parte Lin *et al.* (1997), desarrollan un protocolo para el genotipo tetraploide *Alstroemeria* VV024, induciendo brotes a partir de hojas, sin generación de callos, definiendo como óptimo concentraciones de 1,5 mg L⁻¹ de TDZ y 0,1 mg L⁻¹ de AIB. Posteriormente, estudios desarrollados por Nasri *et al.* (2013) sobre la eficiencia de multiplicación de una especie híbrida de *Alstroemeria ligtu*, observan la formación de brotes adventicios directamente desde la base foliar, sin desarrollo de callos, señalando como óptimo aplicaciones de 1 mg L⁻¹ de BAP y 0,1 mg L⁻¹ de AIB.

LITERATURA CITADA

- Akutsu, M. and H. Sato. 2002. Induction of proembryos in liquid culture increases the efficiency of plant regeneration from *Alstroemeria* calli. *Plant Science*, 163: 475-479.
- Azcón-Bieto, J. y M. Talón. 2008. Fundamentos de fisiología vegetal. 2ª ed. Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana. 650p.
- Bayer, E. 1987. Die gattung *Alstroemeria* in Chile. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München*, 24: 79-83.
- Buitendijk, J.H.; M.S. Ramanna and E. Jacobsen. 1992. Micropropagation ability: towards a selection criterion in *Alstroemeria* breeding. *Acta Horticulturae*, 325: 493-498.
- Chacón, J.; M. Camargo de Assis; A.W. Meerow and S.S. Renner. 2012. From East Gondwana to Central America: historical biogeography of the *Alstroemeriaceae*. *Journal of Biogeography*, 39: 1806-1818.
- Chiari, A. and M.P. Bridgen. 2000. Rhizome splitting: a new micropropagation technique to increase in vitro propagule yield in *Alstroemeria*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62: 39-46.
- Chu, I.Y.E. and S.L. Kurtz. 1990. Commercialization of plant micropropagation: 38p. In: Ammirato, P., D. Evans, W. Sharp and Y. Bajaj (Eds). Handbook of plant cell culture, Vol. 5: Ornamental plants. New York, USA: McGraw-Hill Publishing Company. 833p.
- Cruz, I.; A. Angarita and T. Mosquera. 2003. Induction of somatic embryogenesis in *Alstroemeria* spp. *Agronomía Colombiana*, 21(3): 121-128.
- George, E.F.; M.A. Hall and G.J. De Klerk. 2008. Plant propagation by tissue culture. 3rd ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer. 501p.
- Hartmann, H.T. y D.E. Kester. 1999. Propagación de plantas: principios y prácticas. 2ª ed. México: Compañía Editorial Continental. 760p.
- Hoshino, Y. 2008. Advances in *Alstroemeria* biotechnology. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, 5: 540-546.

Hutchinson, M.J.; J.M. Tsujita and P.K. Saxena. 1994. Callus induction and plant regeneration from mature zygotic embryos of a tetraploid *Alstroemeria* (*A. pelegrina* x *A. psittacina*). *Plant Cell Reports*, 14: 184-187.

Hutchinson, M.J.; R. Onamu; L. Kipkosgei and S.D. Obukosia. 2010. Effect of thidiazuron, NAA and BAP on in vitro propagation of *Alstroemeria aurantiaca* cv. 'Rosita' from shoot tip explants. *The Journal of Agriculture, Science and Technology*, 12(2): 60-69.

Khaleghi, A.; A. Khalighi; A. Sahraroo; M. Karimi; A. Rasoulnia; I.N. Ghafoori. *et al.* 2008. In vitro propagation of *Alstroemeria* cv. 'Fuego'. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 3(3): 492-497.

Kim, J.B.; M. De Jeu; K.J.J.M. Raemakers; E. Jacobsen and R.G.F. Visser. 2001. In vitro studies on callus induction in both vegetative and generative parts in *Alstroemeria* for further application to transformation. *Acta Horticulturae*, 560: 437-439.

Kim, J.B.; C.J.J. Raemakers; E. Jacobsen and R.G.F. Visser. 2006. Efficient somatic embryogenesis in *Alstroemeria*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86: 233-238.

Kristiansen, K.; H. Ornstrup and K. Brandt. 1999. In vitro PPF and media composition affect both *in* and *ex vitro* performance of *Alstroemeria* Butterfly-hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 56: 145-153.

Lin, H.S.; M.J. De Jeu and E. Jacobsen. 1997. Direct shoot regeneration from excised leaf explants of in vitro grown seedlings of *Alstroemeria* L. *Plant Cell Reports*, 16: 770-774.

Lin, H.S.; M.J. De Jeu and E. Jacobsen. 1998. Formation of shoots from leaf axils of *Alstroemeria*: The effect of the position on the stem. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52: 165-169.

Lin, H.S.; C. Van Der Toorn; K.J.J.M. Raemakers; R.G.F. Visser; M.J. De Jeu and E. Jacobsen. 2000. Development of a plant regeneration system based on friable embryogenic callus in the ornamental *Alstroemeria*. *Plant Cell Reports*, 19: 529-534.

Lu, C. and M. Bridgen. 1996. Effects of genotype, culture medium and embryo developmental stage on the in vitro responses from ovule cultures of interspecific hybrids of *Alstroemeria*. *Plant science*, 116(2): 205-212.

Muñoz, M. y A. Moreira. 2003. *Alstroemerias de Chile*. Santiago, Chile: Taller La Era. 140p.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologiae Plantarum*, 15: 473.

Nasri F.; S.N. Mortaza Vi; N. Ghaderi and T. Javadi. 2013. Propagation in vitro of *Alstroemeria ligtu* hybrid through direct organogenesis from leaf base. *Journal of Horticultural Research*, 21(2): 23-30.

Ongaro, V. and O. Leyser. 2008. Hormonal control of shoot branching. *Journal of Experimental Botany*, 59(1): 67-74.

Pedraza-Santos, M.E.; M.C. López-Peralta; V.A. González-Hernández; E.M Engleman-Clark and P. Sánchez-García. 2006. In vitro regeneration of *Alstroemeria* cv. 'Yellow King' by direct organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84: 189-198.

Podwyszynska, M.; E. Gabryszewska and A. Przybyla. 1997. Micropropagation of *Alstroemeria x Hybrida* 'Juanita'. *Acta Horticulturae*, 447: 175-177.

Pumisutapon, P.; R.G.F. Visser and G.J. De Klerk. 2011. Hormonal control of the outgrowth of axillary buds in *Alstroemeria* cultured in vitro. *Biologia Plantarum*, 55(4): 664-668.

Read, P.E. 1990. Environmental effects in micropropagation: 30p. In: Ammirato, P.; D. Evans; W. Sharp and Y. Bajaj (Eds). Handbook of plant cell culture, Vol. 5: Ornamental plants. New York, USA: McGraw-Hill Publishing Company. 833p.

Sagawa, Y. and J. Kunisaki. 1990. Micropropagation of floriculture crops: 32p. In: Ammirato, P.; D. Evans; W. Sharp and Y. Bajaj (Eds.). Handbook of plant cell culture, Vol. 5: Ornamental plants. New York, USA: McGraw-Hill Publishing Company. 833p.

Seyyedyousefi, S.R.; B. Kaviani and N.P. Dehkaei. 2013. The effect of different concentrations of NAA and BAP on micropropagation of *Alstroemeria*. *European Journal of Experimental Biology*, 3(5): 133-136.

Van Schaik, C.E.; A. Posthuma, M.J. De Jeu and E. Jacobsen. 1996. Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on immature embryos of *Alstroemeria* spp. L. *Plant Cell Reports*, 15: 377-380.

Van Zaayen, A. 1995. Virus and Virus-like diseases of bulb and flower crops. West Sussex, UK: Wiley publishers.

Yousef, H.; B. Sahar and H. Abdollah. 2007. In vitro propagation of Alstroemeria using rhizome explants derived in vitro and in plot plants. *African Journal of Biotechnology*, 6(18): 2147-2149.

CAPÍTULO II

**EFFECTO DEL TIPO DE EXPLANTE AÉREO EN LA REGENERACIÓN IN
VITRO DE *Alstroemeria* spp.**

RESUMEN

Alstroemeria se propaga in vitro principalmente a través de rizomas, método que presenta altos niveles de contaminación pese a ser sometida a una laboriosa desinfección, además de ser una técnica destructiva con la planta madre. Por otro lado, el cultivo in vitro de explantes aéreos presenta bajos niveles de contaminación al proveer una simple desinfección. *Alstroemeria caryophyllaea* es la única especie aromática del género, y *Alstroemeria* 'Sweet Laura' corresponde a un híbrido con carácter aromático. Ambos genotipos no poseen protocolos establecidos que permitan su propagación in vitro.

Se evaluó eficiencia y efectividad de regeneración en explantes aéreos de *Alstroemeria*, variando tipo de explante, concentración de citoquinina y genotipo. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado, con arreglo factorial 3 x 4 x 2, desarrollado en dos etapas. La primera fase consideró el desarrollo de explantes en un medio para inducir brotación, y la segunda fase permitió finalizar su regeneración aérea.

Para ambos genotipos estudiados, la concentración correspondiente a 1 mg L⁻¹ de BAP fue suficiente para desarrollar organogénesis directa a partir de brotes utilizados como explantes, siendo más eficiente en el caso de *Alstroemeria* 'Sweet Laura'. Finalmente, se generó un protocolo efectivo y eficiente en regeneración in vitro de *Alstroemeria caryophyllaea* y *Alstroemeria* 'Sweet Laura'.

Palabras Claves: *Alstroemeria caryophyllaea*, *Alstroemeria* 'Sweet Laura', Cultivo de tejidos, Organogénesis Directa, Reguladores de Crecimiento.

Abreviaciones: AIB – ácido indol-3-butírico; ANA – ácido naftalenacético; BAP – 6-bencilaminopurina; MS – medio Murashige y Skoog (1962); TDZ – tiazurón (N-phenyl-N-1,2,3-thidiazol-5-yl urea); 2,4-D – ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

ABSTRACT

Alstroemeria in vitro propagation is mainly performed using rhizomes, method with high levels of pollution despite the application of a laborious disinfection. Furthermore is a destructive technique with the mother plant. On the other hand the in vitro culture of aerial explants shows lower pollution by providing a simple disinfection. *Alstroemeria caryophyllaea* is the only aromatic species in the genus and *Alstroemeria* 'Sweet Laura' corresponds to an hybrid with aromatic character. Both genotypes have no described protocols for their in vitro propagation.

Efficiency and effectiveness of regeneration in aerial explants of *Alstroemeria* was assessed varying type of explant, concentration of cytokinin and genotype. A completely randomized design was used with a factorial arrangement 3 x 4 x 2 developed in two stages. The first stage considered the development of explants in a medium to induce sprouting and in the second phase aerial regeneration was induced.

For both genotypes studied the concentration of 1 mg L⁻¹ BAP was enough to develop direct organogenesis from buds used as explants, where *Alstroemeria* 'Sweet Laura' was more efficient. Finally a protocol was generated for effective and efficient in vitro regeneration of *Alstroemeria caryophyllaea* and *Alstroemeria* 'Sweet Laura'.

Keywords: *Alstroemeria caryophyllaea*, *Alstroemeria* 'Sweet Laura', Direct Organogenesis, Growth Regulators, Tissue Culture.

Abbreviations: BAP – 6-benzylaminopurine; IBA – indole-3-butyric acid; MS – Murashige and Skoog (1962) medium; NAA – naphthalene acetic acid; TDZ – thidiazuron (N-phenyl-N-1,2,3-thidiazol-5-yl urea); 2,4-D – 2,4-dichlorophenoxy acetic acid.

INTRODUCCIÓN

El género *Alstroemeria*, nativo de América del Sur, con Chile y Brasil como los principales centros de biodiversidad, lo componen plantas perennes rizomatosas, que poseen inflorescencias terminales (Bayer, 1987; Muñoz y Moreira, 2003). Se reconoce por su importancia como cultivo ornamental debido a que presenta alta durabilidad en florero, variabilidad en el color de sus flores y bajo gasto energético en la producción del cultivo para uso como flor de corte, maceta y paisajismo (Hoshino, 2008). Debido a estas características, es una flor popular en muchos países, incluyendo Canadá, Japón, Alemania, Reino Unido y Estados Unidos (Lim *et al.*, 2012). El aumento en su demanda se ha traducido en nuevos centros de producción, y se encuentra entre las plantas ornamentales más importantes y deseables del mercado mundial (Shahriari, 2014).

Alstroemeria caryophyllaea Jacq. es una especie aromática nativa de Brasil, sobre la que se encuentra disponible una descripción taxonómica, botánica (Jacquin, 1804; Foster, 1945; Assis, 2004), y una reciente caracterización sobre el perfil aromático y genómico (Aros *et al.*, 2012). Por otra parte, *Alstroemeria* ‘Sweet Laura’ es un cultivar aromático obtenido mediante el cruzamiento de *Alstroemeria aurea* x *Alstroemeria caryophyllaea* (Bridgen *et al.*, 2009). Para ambos genotipos no existen en la actualidad protocolos establecidos que permitan su propagación mediante cultivo *in vitro*.

Se ha utilizado como procedimiento de multiplicación la propagación vegetativa, mediante la división de rizomas a partir de plantas cultivadas en invernadero. Sin embargo, la tasa de multiplicación es baja (Lin *et al.*, 1997) y puede provocar dispersión de virus (Van Zaayen, 1995). Actualmente, se efectúa la técnica de cultivo *in vitro*, la cual consta del cultivo en medios nutritivos de células, tejidos u órganos adquiridos desde plantas madres (George *et al.*, 2008). Este método, permite producir rápidamente gran cantidad de plantas (Khaleghi *et al.*, 2008), las cuales, al aplicar en conjunto con otras técnicas, pueden llegar a estar libres de enfermedades (Buitendijk *et al.*, 1992). Se utiliza MS (Murashige and Skoog, 1962) como medio de cultivo base, el cual posee macro y microelementos, además de vitaminas necesarias para el desarrollo de los explantes. Se puede usar un medio semisólido (gelificado con agar u otros agentes) o líquido, al cual se adiciona sacarosa como carbohidrato de rápida absorción y reguladores de crecimiento vegetal (Hoshino, 2008).

Diversas características genéticas se han mejorado en *Alstroemeria*, generando variabilidad en la morfología del rizoma, en las características de sus flores y en la resistencia a virus, lo que ha permitido obtener variados cultivares (Buitendijk *et al.*, 1992). Sin embargo, no ha sido posible acelerar la propagación de esta planta a través de división de rizomas. Mediante la técnica de cultivo *in vitro*, *Alstroemeria* se propaga principalmente a través de

rizomas (Yousef *et al.*, 2007), aunque por tratarse de órganos subterráneos presentan altos niveles de contaminación, pese a aplicar una laboriosa desinfección, además de ser una técnica destructiva con la planta madre (Pedraza-Santos *et al.*, 2006; Yousef *et al.*, 2007). Se considera que en monocotiledóneas, como es el caso de alstroemeria, no es posible regenerar plántulas a partir de explantes aéreos, como hojas y tallos (Hoshino, 2008). Lin *et al.* (1997), desarrollan un protocolo único en micropropagación de alstroemeria utilizando hojas como explantes, y con posterioridad Pedraza-Santos *et al.* (2006), logran regenerar plántulas de manera directa a partir de inflorescencias inmaduras.

Dentro de los factores internos que regulan los procesos de crecimiento y desarrollo en las plantas, cabe señalar la interacción entre los reguladores de crecimiento. Específicamente entre auxinas, tales como ácido indol-3-butírico (AIB) y ácido α -naftalenacético (ANA), y citoquininas, como bencilaminopurina (BAP) y tidiazurón (TDZ). Las primeras, se transportan basipétalmente de forma activa por los brotes, inhibiendo el crecimiento de yemas, y están implicadas en procesos de división, crecimiento y diferenciación de las células, y las segundas, se transportan acropétalmente promoviendo el crecimiento de yemas, y son capaces de estimular la división celular en presencia de auxinas (Azcón-Bieto y Talón, 2008; Ongaro and Leyser, 2008). Se deben emplear en diferentes concentraciones y combinaciones, dependiendo el tipo de explante usado y objetivo final, siendo utilizadas en general concentraciones entre 0,5-2,5 mg L⁻¹ de BAP y 0,1-0,2 mg L⁻¹ de AIB (Chiari and Bridgen, 2000; Cruz *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006; Yousef *et al.*, 2007; Khaleghi *et al.*, 2008; Hutchinson *et al.*, 2010; Pumisitapon *et al.*, 2011; Seyyedyousefi *et al.*, 2013).

La opción de usar explantes aéreos se vislumbra como posibilidad en la medida que se seleccione adecuadamente, considerando el material más nuevo que esté disponible por el hecho de poseer células en constante división y elongación, y que por lo tanto facilitará la formación de nuevos tejidos, sea directa o indirectamente (Lin *et al.*, 1998; Ongaro and Leyser, 2008; Pumisitapon, 2011). Además, es importante tener en cuenta la aplicación de una correcta desinfección al explante (Pedraza-Santos *et al.*, 2006). De acuerdo con el sinergismo que se produce entre auxinas y citoquininas, se puede seleccionar un medio de cultivo enfocado a la regeneración de *Alstroemeria* spp. En base a experiencias, es posible señalar que el uso de bajas concentraciones de auxinas (0,1 mg L⁻¹ de ANA o AIB) en combinación con citoquininas aumenta la regeneración de brotes, mientras que medios que no posean citoquininas promueven crecimiento, debido a la dominancia apical provocada por la estimulación de auxinas naturalmente internas en la especie, lo que es importante considerar si se requiere mayor crecimiento del explante y no de brotes (Pedraza-Santos, 2006; Ongaro and Leyser, 2008). Hacer una distinción con respecto al genotipo es relevante en el sentido de evaluar regeneración y proliferación, ya que se ha demostrado que cada genotipo tiene una eficiencia propia de desarrollo (Lin *et al.*, 1997; Chiari and Bridgen, 2000; Pedraza-Santos *et al.*, 2006; Hoshino, 2008). Por lo tanto, es necesario desarrollar un protocolo de regeneración in vitro específico para cada especie en estudio.

HIPÓTESIS

Brotes de *Alstroemeria* spp. cultivados in vitro son más eficientes en organogénesis directa que hojas y tallos, independiente del genotipo.

OBJETIVO GENERAL

Generar un protocolo eficiente de regeneración in vitro para *Alstroemeria* spp. (*A. caryophyllaea* y *A. 'Sweet Laura'*), a partir de explantes aéreos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar eficiencia¹ y efectividad² en regeneración in vitro de *Alstroemeria* spp. a partir de distintos explantes aéreos.
- Evaluar el efecto de citoquinina (BAP) durante el desarrollo de explantes aéreos de *Alstroemeria* spp. cultivados en medio de inducción.
- Evaluar el efecto genotipo sobre la regeneración in vitro de *Alstroemeria* spp.

¹ Considera la prolificidad del explante (brotación/unidad de tiempo).

² Considera desarrollar organogénesis directa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del Estudio

El presente estudio se desarrolló en el ‘Laboratorio de Cultivo de Tejidos’ de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Material Vegetal

A partir de plantas cultivadas en invernadero de *Alstroemeria caryophyllaea*, provenientes de selecciones realizadas en el Programa de Mejoramiento Genético de Alstroemeria de la Universidad de Chile, y *Alstroemeria* ‘Sweet Laura’, híbrido entre *A. caryophyllaea* x *A. aurea*, obtenida desde el Programa de Mejoramiento Genético de Alstroemeria de Cornell University (Nueva York, EE.UU), se obtuvieron tres tipos de explantes aéreos: hojas, brotes y tallos. Se utilizaron las cinco primeras hojas apicales completamente desarrolladas, obtenidas desde brotes jóvenes, seccionándolas de manera de contener aproximadamente 1 mm de tallo (figura 3.a). Para el caso de brotes, se utilizaron aquellos recién emergidos sin hojas extendidas, hasta de 1 cm de longitud (figura 3.b y 3.c). Para la selección de tallos, se utilizaron secciones apicales de 1 cm de longitud conteniendo la sección nodal (figura 3.d).

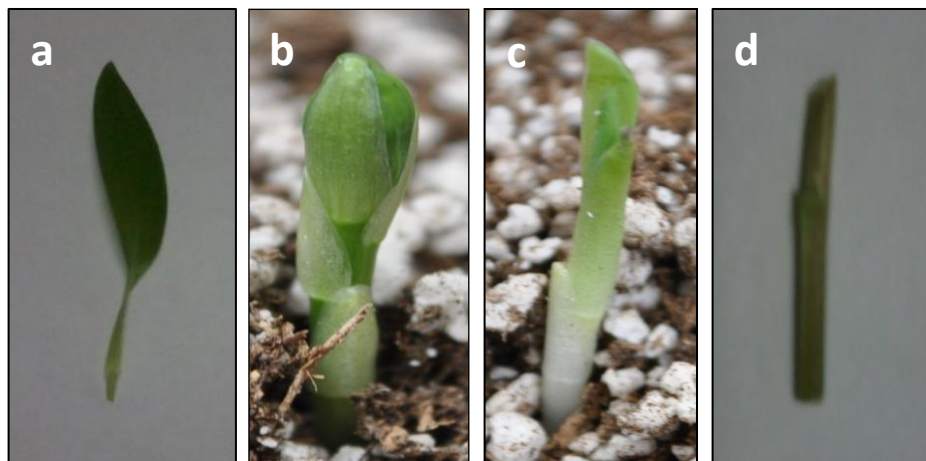


Figura 3. Explantes aéreos utilizados para evaluar organogénesis directa en cultivo in vitro de *Alstroemeria* spp.: (a) Hoja de *A.* ‘Sweet Laura’; (b) brote de *A.* ‘Sweet Laura’; (c) brote de *A. caryophyllaea* y (d) tallo de *A.* ‘Sweet Laura’.

Se aplicaron 24 tratamientos (cuadro 1) sobre la unidad experimental (Figura 4), consistente en una placa Petri con un explante. Cada tratamiento se repitió quince veces, estableciendo un diseño completamente aleatorizado.



Figura 4. Unidad experimental utilizada para evaluar organogénesis directa a partir de explantes aéreos de *Alstroemeria* spp. cultivados in vitro.

Desinfección de Explantes

Los explantes fueron sumergidos en una solución de 15% v/v de cloro comercial (6% ingrediente activo) en constante agitación, durante 15 minutos. Posteriormente, se enjuagaron tres veces, durante 3 minutos cada vez, con agua destilada esterilizada en un autoclave vertical (modelo OT40L, Nüve, Turquía), durante 15 minutos a 121°C.

Etapas 1: medio de inducción

Se evaluó regeneración en explantes aéreos de *Alstroemeria* spp., según el efecto de tres factores: explante, concentración de citoquinina y genotipo, con tres, cuatro y dos niveles, respectivamente (cuadro 1).

Se realizó el cultivo estéril de cada explante (1 explante/placa) en placas Petri (desechables, de 60 x 15 mm) conteniendo 20 ml de medio MS (Murashige and Skoog, 1962) y 30 g L⁻¹ de sacarosa, gelificado con 7 g L⁻¹ de agar, ajustando el pH en 5,8 ± 1. Para provocar la inducción del explante, el medio se suplementó con 0,1 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) y con 0; 0,5; 1 y 2 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP), de acuerdo a los distintos niveles descritos para el factor concentración de citoquinina.

Cuadro 1. Detalle de los factores evaluados sobre organogénesis directa a partir de explantes aéreos de *Alstroemeria* spp. cultivados in vitro.

FACTOR	NIVEL
Explante	Brote
	Hoja
	Tallo
Concentración Citoquinina (BAP)	0,0 mg L ⁻¹
	0,5 mg L ⁻¹
	1,0 mg L ⁻¹
	2,0 mg L ⁻¹
Genotipo	<i>Alstroemeria caryophyllaea</i>
	<i>Alstroemeria</i> ‘Sweet Laura’

La mantención de los explantes in vitro se realizó en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas, con fotoperiodo regulado en 16/8 horas de luz/oscuridad (régimen proveído por lámparas con densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 900 μmol de fotones $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y temperatura de 20 ± 1 °C.

Los explantes que mostraron signos de inducción, fueron traspasados al medio de regeneración, contemplado en la etapa 2 (figura 5). Se consideró 30 días como periodo máximo de mantención en esta etapa.

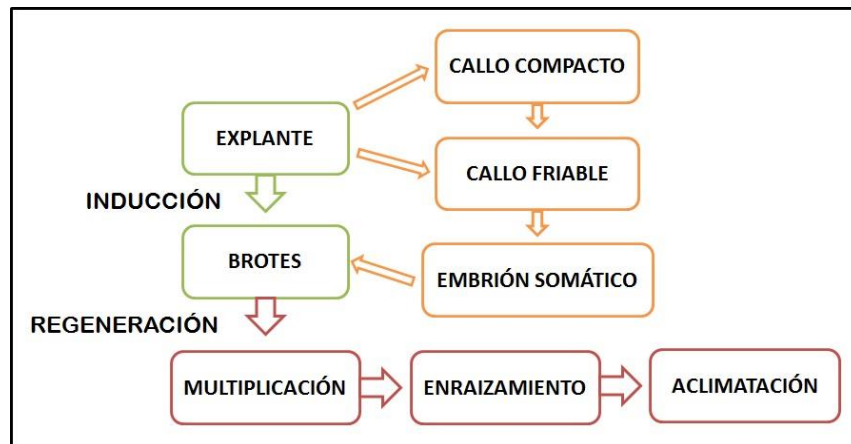


Figura 5. Detalle de metodología para organogénesis a partir de explantes aéreos de *Alstroemeria* spp. cultivados in vitro.

Estudio histológico

Se tomaron muestras de hojas de *Alstroemeria* 'Sweet Laura' inducidas en el medio con 1 mg L^{-1} de BAP, para realizar un estudio histológico los días 0 y 7 desde que se inició su cultivo in vitro. Se realizaron cortes histológicos transversales, según la metodología señalada por Prat *et al.* (2008), de tejidos ubicados en el pecíolo de la hoja. Las muestras fueron fijadas en una solución de FAA (4% formalina, 70% ácido acético, 70% alcohol, en una relación de 5:5:90 v/v), luego deshidratadas en etanol (70, 80 y 90%, durante 30 minutos cada vez), y finalmente infiltradas en plástico JB4 (Polyscience, Inc., Warrington, PA). Mediante un ultramicrotomo (modelo 1516, Leitz, Alemania) se realizaron los cortes de $10 \mu\text{m}$ de espesor, se montaron sobre un portaobjeto sellado con bálsamo de Canadá, y posteriormente se realizó la tinción de las muestras con azul de toluidina para su observación y fotografía bajo microscopía óptica.

Etapa 2: medio de regeneración

Los explantes que presentaron signos de brotación, expresados en cambios de forma (protuberancias de 1 mm) y/o de color (blanquecino o cremoso), se traspasaron a esta etapa para continuar su desarrollo. Se establecieron en tubos de ensayo (1 explante/tubo) conteniendo 10 ml de medio líquido con MS (Murashige and Skoog, 1962) y 30 g L^{-1} de sacarosa, suplementado con 2 mg L^{-1} de BAP, y ajustando el pH en $5,8 \pm 1$.

La mantención de los explantes in vitro se realizó en una cámara de crecimiento, manteniendo las condiciones señaladas para la etapa I, considerando 60 días como periodo máximo de desarrollo de los explantes en esta etapa.

Evaluación de Efectividad

Con la finalidad de determinar la efectividad de regeneración se realizaron evaluaciones cualitativas, que permitieron determinar la ocurrencia de desarrollo a partir del explante. Se consideró el número de explantes inducidos, necrosados, torcidos, oxidados y/o contaminados. Además, se evaluó el número de explantes regenerados directamente a partir del explante inicial, para lo que se consideró crecimiento desde 1 mm de longitud y/o ensanchamiento. Por otra parte, se consideró el número de explantes con desarrollo de callos, para evaluar el porcentaje de organogénesis directa.

Por otra parte, se realizaron muestras histológicas a partir de explantes desarrollados durante el periodo de inducción, con la finalidad de determinar la zona meristemática a partir de la cual se induce la organogénesis.

Evaluación de Eficiencia

Las mediciones cuantitativas para evaluar la eficiencia consideró el número de explantes regenerados de manera directa, desde 1 mm de longitud en brotes (tallo + hojas), durante el transcurso de cuatro semanas. Además, esta evaluación se complementó con las evaluaciones de número de brotes/explante, longitud de brotes (cm)/explante, ancho de brotes (cm)/explante, número de hojas/explante, longitud de hojas (cm)/brote, y ancho de hojas (cm)/brote.

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos a partir de las variables evaluadas, fueron transformados para su análisis. Usando la transformación de Bliss ($\arcsen\sqrt{\%}$), para el caso de los datos cualitativos, y la transformación logarítmica, para el caso de los datos cuantitativos. Se realizó un análisis de varianza, a través del programa Infostat, con motivo de evaluar la interacción entre los niveles de los diferentes factores, mediante el Test de Comparaciones Múltiples de Tukey, con un 95% de confianza ($\alpha = 0,05$). En la situación de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre las medias evaluadas, se analizó de manera independiente cada factor.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección de explantes

Previamente a la ejecución del presente estudio se realizaron distintas pruebas de desinfección, a partir de las que es posible señalar que para explantes aéreos de *Alstroemeria* spp. es suficiente una aplicación de 15% v/v de cloro comercial. Concentraciones superiores, y/o en conjunto con otros productos, generan clorosis y desgastan el tejido vegetal, impidiendo la continuidad del cultivo in vitro. Con la desinfección aplicada sobre cada explante cultivado se obtuvo un 100% de efectividad, contrastando con el 5-10% de contaminación que desarrollaron los explantes aéreos evaluados por Pedraza-Santos *et al.* (2006), al realizar su inmersión en 20% v/v de cloro comercial (6% ingrediente activo). Por otra parte, en el caso de utilizar rizomas como explantes la desinfección aplicada debe ser mucho más severa. Según estudios relacionados, se debe aplicar un lavado con agua corriente, siguiendo con una desinfección con etanol (70% v/v) durante 30 segundos, y posteriormente con cloro comercial entre 20 y 30 minutos dependiendo de la concentración aplicada (20-40% v/v), finalizando con tres enjuagues con agua destilada estéril durante 10 minutos cada uno (Yousef *et al.*, 2007; Seyyedyousefi *et al.*, 2013), sin embargo se desconocen los porcentajes de esterilización otorgados con esta aplicación.

Al lograr una óptima desinfección en los explantes, se asegura su condición aséptica durante el cultivo in vitro hasta el periodo de aclimatación. Considerando el éxito obtenido en esta etapa, se propone su aplicación para cultivo in vitro de explantes aéreos, independiente del genotipo o incluso de la especie utilizados.

Efectividad

Se obtuvo organogénesis directa a partir de brotes y hojas de *Alstroemeria caryophyllaea*, y en brotes, hojas y tallos de *Alstroemeria* 'Sweet Laura'. A partir de la primera etapa de cultivo se obtuvo el mayor porcentaje de inducción en brotes cultivados con 1 mg L⁻¹ de BAP, con 53% para *A. caryophyllaea* y 100% para *A.* 'Sweet Laura', y la menor respuesta (13% y 33%, respectivamente) se obtiene sin suplementación de BAP en el medio (cuadro 2). Durante su desarrollo, los brotes lograron reactivarse y elongarse, aumentaron su tamaño y desplegaron sus hojas (figura 6.a). En el cultivo de hojas, la mayor inducción se

logra en aquellas suplementadas con 1 mg L^{-1} de BAP, con un 47% para ambos genotipos, mientras que aquellas cultivadas sin BAP no generan respuesta de inducción (cuadro 2).

La inducción de nuevos brotes en hojas fue observada a partir de la base del pecíolo, zona que desarrolló ensanchamiento, y cambió de color verde a blanquecino (figura 6.b). A partir de lo anterior, es posible señalar que las hojas requieren impulsar su regeneración con aplicaciones de BAP, aunque al aplicar concentraciones mayores a 1 mg L^{-1} de BAP ocurre una reducción en la respuesta de regeneración. Similar a lo observado por Nasri *et al.* (2013), donde concentraciones de 1 mg L^{-1} de BAP y $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB generan la mayor inducción de explantes (4 brotes/explante) sin generación de callos, y al incrementar la concentración de BAP (2 mg L^{-1}) ocurre una disminución en la respuesta (1,7 brotes/explante).

Los resultados obtenidos en la inducción de brotes y hojas para ambos genotipos estudiados son bastante similares al aplicar igual suplementación de reguladores de crecimiento. Sin embargo, la inducción a partir de tallos se observa sólo en *A. 'Sweet Laura'* con la mayor respuesta (47%) obtenida en el medio de cultivo suplementado con 1 mg L^{-1} de BAP (cuadro 2), generándose elongación y desarrollo de hojas desde la zona apical (figura 6.c), sin lograr respuesta en el medio de cultivo sin suplementación con BAP (cuadro 2).

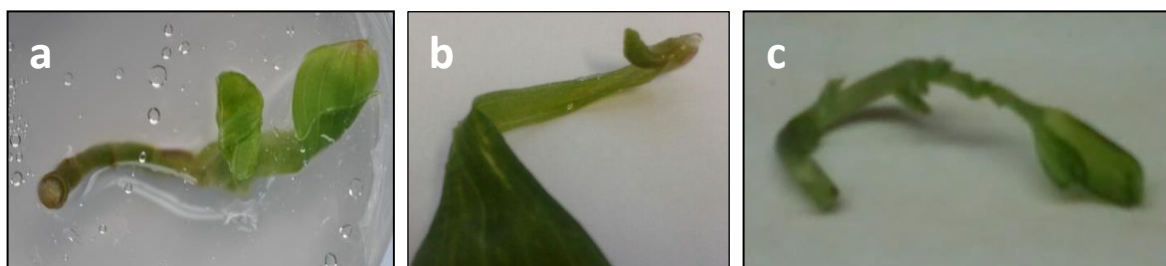


Figura 6. Respuesta de inducción en explantes aéreos de *Alstroemeria* ‘Sweet Laura’ cultivados in vitro. (a) Brote de 10 días; (b) hoja de 20 días; (c) tallo de 30 días.

Respecto a la observación de organogénesis directa, resultados similares fueron obtenidos en estudios con *Alstroemeria* spp. realizados por Lin *et al.* (1997) y Nasri *et al.* (2013) a partir de hojas, y en inflorescencias inmaduras con Pedraza-Santos *et al.* (2006). Resultados contrastantes frente lo señalado por Hoshino (2008), quien considera que para monocotiledóneas, como es el caso de alstroemeria, no es factible lograr organogénesis a partir de hojas o tallos. En relación a la regeneración a partir de hojas, Lin *et al.* (1997) obtuvieron resultados similares, observando elongación del pecíolo y ensanchamiento de la zona nodal, aplicando $2,2 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ, y además Lin *et al.* (1998) y Nasri *et al.* (2013) obtienen inducción a partir de la zona ubicada entre la base de la hoja y el tejido del tallo, este último aplicando 1 mg L^{-1} de BAP. El largo del pecíolo adherido a la hoja puede afectar la frecuencia de regeneración y el número de brotes inducidos por explante

cultivado (Lin *et al.*, 1997), lo cual se comprobó con ensayos previos en donde se realizaron distintos tipos de corte en las hojas, variando la cantidad de pecíolo conservada en el explante. Se observó que al seccionar a través de la porción nodal y realizar en diagonal el corte superior, se logra la inducción a partir de hojas.

Cuadro 2. Respuesta de organogénesis directa a partir de explantes aéreos de *Alstroemeria caryophyllaea* y *Alstroemeria* 'Sweet Laura' cultivados in vitro.

FACTORES			VARIABLES	
GENOTIPO	TIPO EXPLANTE	[BAP]	EXPLANTES INDUCIDOS (%)	EXPLANTES REGENERADOS (%)
<i>Alstroemeria caryophyllaea</i>	Brote	0,0	13	7
		0,5	27	13
		1,0	53	33
		2,0	47	20
	Hoja	0,0	0	0
		0,5	0	0
		1,0	47	20
		2,0	13	7
	Tallo	0,0	0	0
		0,5	0	0
		1,0	0	0
		2,0	0	0
<i>Alstroemeria</i> 'Sweet Laura'	Brote	0,0	33	20
		0,5	73	47
		1,0	100	67
		2,0	47	33
	Hoja	0,0	0	0
		0,5	20	13
		1,0	47	33
		2,0	7	7
	Tallo	0,0	0	0
		0,5	20	0
		1,0	47	27
		2,0	13	13

Durante el desarrollo de todos los tipos de explantes en el medio de inducción no se obtuvo generación de callos, lo que es positivo en propagación clonal de cultivares debido a que disminuye el riesgo de generar variabilidad genética producto de la regeneración somaclonal. Este resultados concuerda con los resultados obtenidos por Lin *et al.* (1997; 1998) y Nasri *et al.* (2013), quienes tampoco obtuvieron generación de callos. Sin embargo, Cruz *et al.* (2000) y Pedraza-Santos *et al.* (2006), señalan que a partir de brotes y hojas cultivadas en medios con TDZ y AIB o con BAP y KIN, respectivamente, se tiende al desarrollo de callos con potencial para inducir embriogénesis somática. Lin *et al.* (2000),

hacen mención a la generación de callos compactos a partir de segmentos nodales de tallo, y Pedraza-Santos *et al.* (2006), sugieren que hojas y tallos son explantes con potencial para generar callos embriogénicos.

En relación al tipo de explante utilizado se observa que para el caso de los dos genotipos estudiados, el brote fue el explante que logró una mayor respuesta en inducción, estadísticamente significativa, con 35% para el caso de *A. caryophyllaea* y un 63% para *A. 'Sweet Laura'*, en comparación a hojas, con un 15% y 18% respectivamente, y tallos con 20% de inducción sólo para el caso de *A. 'Sweet Laura'* (cuadro 3). Entre ambos genotipos, *A. 'Sweet Laura'* es el que logra inducir mayor respuesta significativa, con 63% y 20% para brotes y tallos respectivamente, mientras que en hojas no hay diferencias significativas entre ambos genotipos. Con respecto al cultivo de tallos usados como explantes, es evidente la diferencia entre ambos genotipos debido a que sólo aquellos obtenidos de *A. 'Sweet Laura'* desarrollan inducción (cuadro 3). En estudios desarrollados por Lin *et al.* (1997), se logra un 36% de inducción de brotes en hojas de *Alstroemeria* 'VV024', mientras que Pedraza-Santos *et al.* (2006), en evaluaciones realizadas con *Alstroemeria* 'Yellow King', no logró organogénesis directa a partir de hojas y tallos, sólo a partir de inflorescencias consiguiendo un 40% de inducción.

Cuadro 3. Respuesta de la interacción entre los niveles del factor genotipo y del factor explante, evaluados en la variable explantes inducidos (n=60).

GENOTIPO	EXPLANTE	EXPLANTES INDUCIDOS (%)		
<i>Alstroemeria caryophyllaea</i>	Brote	35	a*	B**
	Hoja	15	b	A
	Tallo	0	b	B
<i>Alstroemeria 'Sweet Laura'</i>	Brote	63	a	A
	Hoja	18	b	A
	Tallo	20	b	A

(*) Letras minúsculas iguales indican que no existen diferencias entre los distintos niveles de explante, evaluado dentro de cada nivel de genotipo.

(**) Letras mayúsculas iguales indican que no existen diferencias entre los distintos genotipos, para un mismo nivel de explante.

Al observar la interacción entre la concentración de citoquinina y el genotipo, se obtiene la mayor respuesta de inducción en aquellos explantes cultivados con 1 mg L⁻¹ de BAP, observándose diferencias significativas entre ambos genotipos, con 33% para *A. caryophyllaea* y 64% para *A. 'Sweet Laura'* (cuadro 4). El menor valor de inducción se obtiene con el medio sin suplementación de BAP en *A. caryophyllaea* (4%) y *A. 'Sweet Laura'* (11%). Aunque la aplicación de 0,5 mg L⁻¹ de BAP al medio de cultivo permite la inducción de explantes aéreos, representando aproximadamente un tercio de la respuesta obtenida con la aplicación de 1 mg L⁻¹ de BAP, para ambos genotipos (cuadro 4).

Nasri *et al.* (2013) obtuvo resultados similares utilizando explantes de un híbrido de *Alstroemeria ligtu*, observando la mayor regeneración con suplementación de 1 mg L⁻¹ de BAP y 0,1 mg L⁻¹ de AIB. Mientras que Lin *et al.* (1997), obtienen con 2,2 mg L⁻¹ de TDZ el mayor porcentaje de regeneración con explantes de *Alstroemeria* 'VV024'. De acuerdo con literatura relacionada (Azcón-Bieto y Talón, 2008; George *et al.*, 2008; Ongaro and Leyser, 2008), aquellos explantes que producen inducción pese a ser cultivados en medios sin BAP, podrían estar reflejando un efecto provocado por las hormonas endógenas del tejido vegetal.

Cuadro 4. Respuesta de la interacción entre los niveles del factor genotipo y del factor concentración citoquinina, evaluados en la variable explantes inducidos (n=45).

GENOTIPO	CONCENTRACIÓN CITOQUININA		EXPLANTES INDUCIDOS (%)	
<i>Alstroemeria caryophyllaea</i>	0,0	4	b*	A**
	0,5	9	b	A
	1,0	33	a	B
	2,0	20	ab	A
<i>Alstroemeria</i> 'Sweet Laura'	0,0	11	c	A
	0,5	38	b	A
	1,0	64	a	A
	2,0	22	bc	A

(*) Letras minúsculas iguales indican que no existen diferencias entre los distintos niveles de concentración citoquinina, evaluado dentro de cada nivel de genotipo.

(**) Letras mayúsculas iguales indican que no existen diferencias entre los distintos genotipos, para un mismo nivel de concentración citoquinina.

Se observa para ambos genotipos, que aquellos explantes cultivados sin suplemento de citoquinina logran regenerar, aunque en la menor cantidad. Al suministrar el medio de cultivo con 0,5 o con 1 mg L⁻¹ de BAP, se observa un aumento progresivo en la inducción generada. Aunque al ser cultivados con 2 mg L⁻¹ de BAP se observa una disminución en la inducción de los explantes (figura 7). Nasri *et al.* (2013) concuerdan con este resultado, señalando que un aumento en la concentración de BAP de 0 a 1 mg L⁻¹ provoca un aumento en el número de brotes y yemas, aunque un aumento adicional en dicha concentración provoca reducción en el número de brotes. Reguladores de crecimiento administrados en niveles superiores al óptimo inhiben las respuestas morfogénicas, posiblemente debido a un mecanismo de retroalimentación negativa (Hutchinson *et al.*, 2010). A partir de esto, es posible señalar que una concentración de 1 mg L⁻¹ de BAP es suficiente para regenerar explantes aéreos, en tanto que al suplementar con 2 mg L⁻¹ se podría estar generando algún tipo de toxicidad. Por otra parte, con el objetivo de aumentar la inducción en cultivo in vitro de explantes aéreos, Pedraza-Santos *et al.* (2006) sugieren el uso de medio líquido, con el cual logran triplicar el número de brotes adventicios en el 30% de los explantes iniciados, atribuyendo una mayor difusión de iones y oxígeno, y por lo tanto una mayor absorción de

nutrientes por el explante, a diferencia del medio de cultivo gelificado utilizado en esta investigación y en otros estudios (Lin *et al.*, 1997; Nasri *et al.*, 2013).

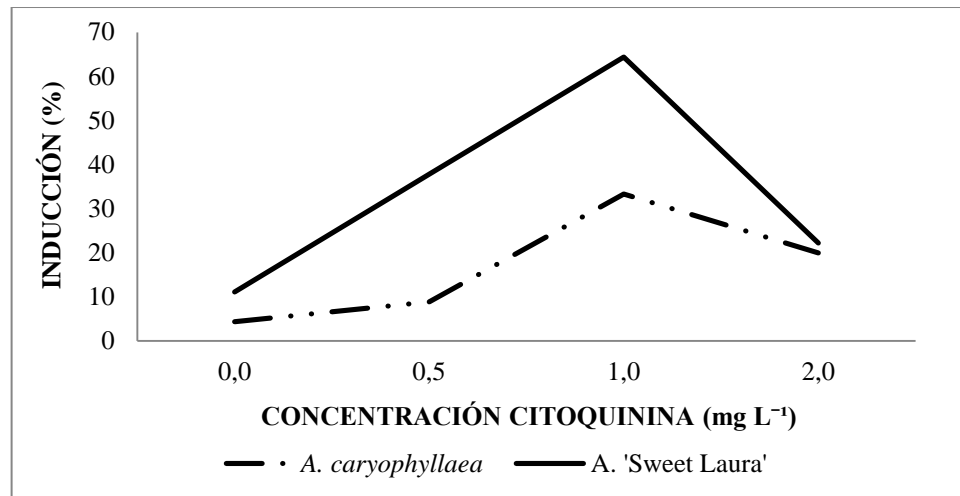


Figura 7. Efecto de la concentración de citoquinina suplementada al medio, evaluado durante la inducción de explantes aéreos de *Alstroemeria* spp. cultivados in vitro.

Durante el cultivo in vitro de explantes aéreos de *Alstroemeria* spp. se observó el desarrollo de torceduras, presentando diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos de explantes utilizados, para ambos genotipos (cuadro 5), pero demostró ser irrelevante para la regeneración de dichos explantes. Para el caso de hojas se observó un leve arrugamiento de estas sobre el medio de cultivo, y son las más relevantes ya que se presentó en un 100%. Para el caso de tallos, se obtuvo torción del explante en un 78% para *A. caryophyllaea* y en un 35% para *A. 'Sweet Laura'*. En el caso de brotes, se produjo un enrollamiento sobre sí mismo a medida que iba elongándose, con un 8% para *A. caryophyllaea* y un 20% para *A. 'Sweet Laura'*.

Cuadro 5. Respuesta de la interacción entre los niveles del factor genotipo y del factor explante, evaluados en la variable explantes torcidos (n=60).

GENOTIPO	EXPLANTE	EXPLANTES TORCIDOS (%)		
<i>Alstroemeria caryophyllaea</i>	Brote	8	c*	A**
	Hoja	100	a	A
	Tallo	78	b	A
<i>Alstroemeria 'Sweet Laura'</i>	Brote	20	b	A
	Hoja	100	a	A
	Tallo	35	b	B

(*) Letras minúsculas iguales indican que no existen diferencias entre los distintos niveles de explante, evaluado dentro de cada nivel de genotipo.

(**) Letras mayúsculas iguales indican que no existen diferencias entre los distintos genotipos, para un mismo nivel de explante.

Durante su desarrollo en el medio de cultivo, algunos explantes generaron necrosis sobre el tejido. Esto ocurrió en un nivel mínimo, correspondiente a 7 hojas de un total de 360 explantes cultivados, y no reflejó efectos sobre el desarrollo de dichos explantes. Por otra parte, se observó oxidación en el caso de algunos explantes, y esto podría relacionarse con su regeneración ya que se evidenció una disminución en la regeneración al ocurrir un aumento de oxidación. En el caso más emblemático se encuentran los tallos, que generan un 100% de oxidación en contraste con el 5% de regeneración producida. En hojas, se observó un 57% de oxidación versus el 10% de explantes regenerados, y en brotes se obtuvo un 2% de oxidación contrapuesto con un 30% en regeneración (figura 8).

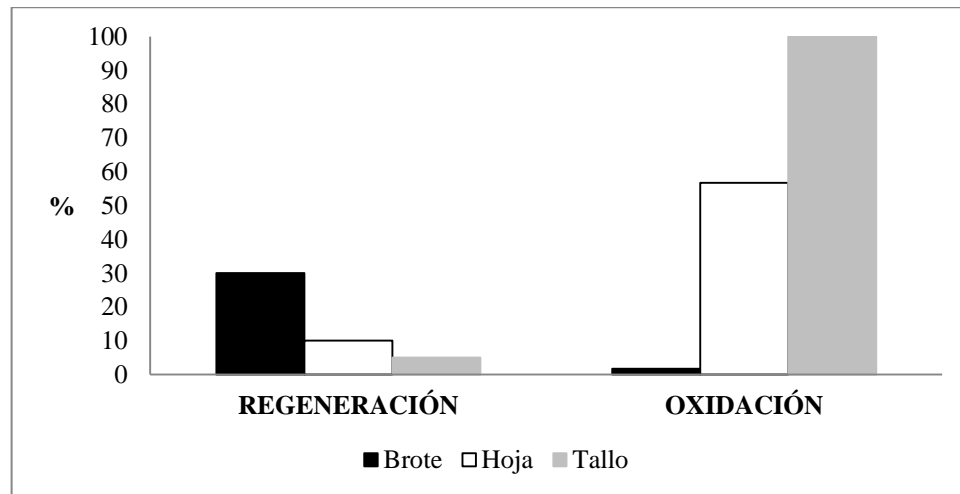


Figura 8. Respuestas de las variables regeneración versus oxidación obtenidas en cultivo in vitro de explantes aéreos de *Alstroemeria* spp.

Lo anterior se puede explicar debido a que cuando la absorción de luz en el tejido foliar supera su capacidad fotosintética se acumula energía, que posteriormente producirá especies reactivas al oxígeno, las cuales provocan un deterioro fotooxidativo (Azcón-Bieto y Talón, 2008). En estudios realizados por Lin *et al.* (1998), se observó que aquellos explantes sin regeneración se tornaron de color café. Mientras que en ensayos in vitro cultivados en luz y oscuridad realizados por Pedraza-Santos *et al.* (2006), se observa que al ser cultivados en oscuridad, los explantes no generan tejido oxidado.

Luego de evaluar la inducción generada en los explantes cultivados durante la primera etapa, se evaluó aquellos explantes que lograron finalizar su regeneración durante la segunda etapa de cultivo, encontrando un efecto significativo de cada factor por separado. *Alstroemeria* 'Sweet Laura' logró un 25% más de regeneración que *Alstroemeria caryophyllaea* (figura 9.a), siendo el brote el tipo de explante que desarrolla mayor regeneración estadísticamente significativa, en comparación a hojas o tallos (figura 9.b). Al suplementar el medio de cultivo con 1 mg L⁻¹ de BAP, se logra el máximo de regeneración,

sin obtener diferencias estadísticamente significativas entre los demás tratamientos con BAP (figura 9.c).

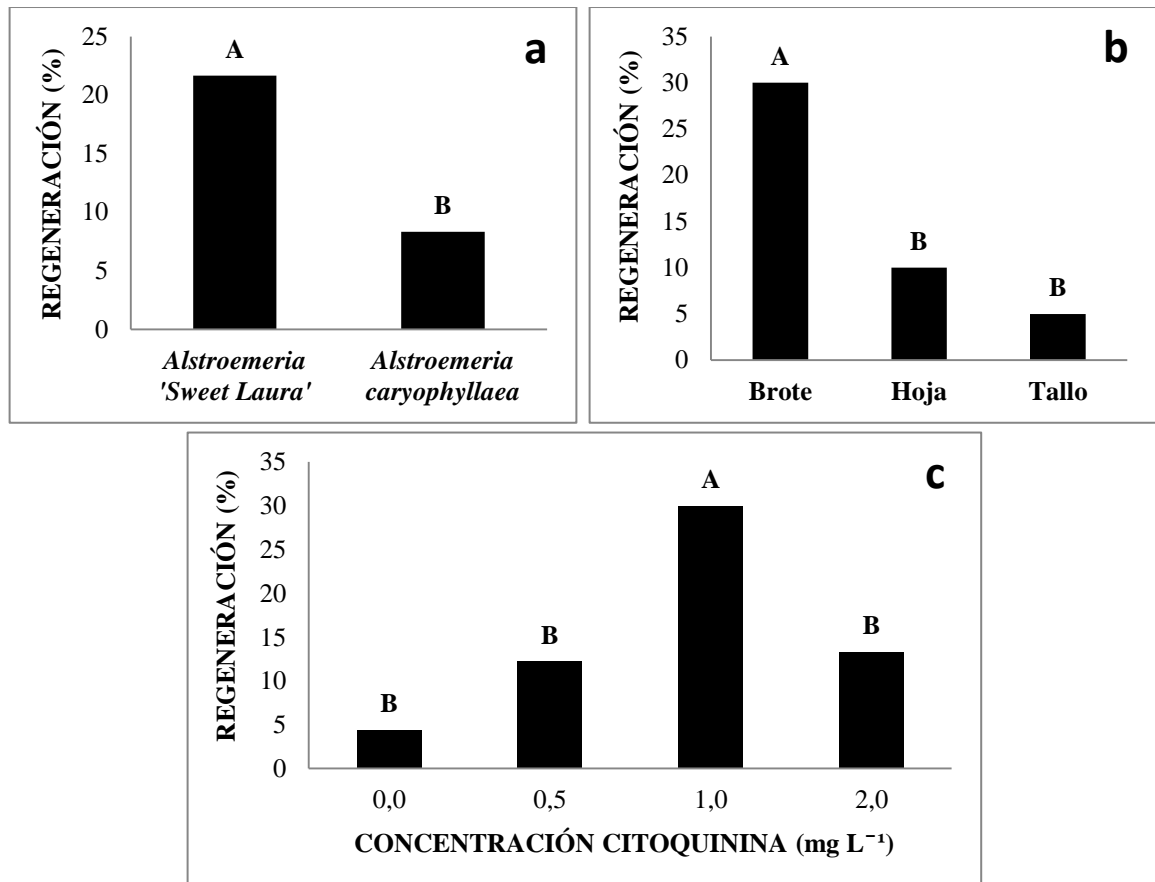


Figura 9. Efecto de los factores genotipo (a) (n=180); explante (b) (n=120); y concentración de citoquinina (c) (n=90), evaluados durante la regeneración de explantes aéreos de *Alstroemeria* spp. cultivados in vitro. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Al igual que Nasri *et al.* (2013), es factible señalar que el suplemento con BAP tiene un importante rol en la regeneración de *Alstroemeria* spp., sin olvidar su combinación con AIB ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) en el medio de cultivo, mientras Hutchinson *et al.* (2010), encuentra óptimos resultados al combinar BAP (1 mg L^{-1}) con una mínima aplicación de ANA ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$). Seyyedyousefi *et al.* (2013), señalan que la presencia de baja concentración de ANA en el medio de cultivo es necesario para el crecimiento de los primordios foliares. Aunque Lin *et al.* (1997), indican que un aumento en la concentración de TDZ, desde $0,5$ a $2,2 \text{ mg L}^{-1}$, induce el más alto porcentaje de brotación, además de una temprana formación de brotes.

Cabe destacar el crecimiento de los brotes cultivados en medio sin suplementación de citoquinina, para ambos genotipos, ya que demuestra que por sí mismas estas especies son capaces de reiniciar su crecimiento, pero que al ser suplementadas con BAP aceleran este

proceso. Se considera el uso de BAP como el regulador de crecimiento más efectivo para la regeneración de plántulas (Hoshino, 2008), y según Pumisitapon *et al.* (2011), el uso de citoquinina en cultivo *in vitro* de *Alstroemeria* permiten reanudar el crecimiento en explantes aéreos, aunque no en un 100%, sugiriendo un fuerte nivel de dominancia apical en la especie. El mecanismo indirecto de acción en auxinas, que promueve la dominancia apical, contrasta con el mecanismo directo de acción en citoquininas (Ongaro and Leyser, 2008), y esta actividad sinérgica permitiría reactivar y reanudar la brotación en los explantes aéreos de *Alstroemeria* spp. cultivados *in vitro*.

Análisis histológico

Secciones transversales de pecíolos de hoja fueron analizadas para identificar los posibles tejidos inducidos y diferenciados a brotes adventicios. Al observar un corte transversal de pecíolo al día inicial de su cultivo *in vitro* (figura 10.a), se aprecian haces vasculares repartidos en un parénquima de células de mayor tamaño que la capa de células epidermales. No se observan estructuras con células más pequeñas que evidencien el desarrollo de posibles meristemos. Por otra parte, a los 7 días post inducción (medio con 1 mg L^{-1} de BAP) se observa una transición en la capa epidermal de los pecíolos de hoja, que pierden el orden original produciendo una morfología con protuberancias (figura 10.b).

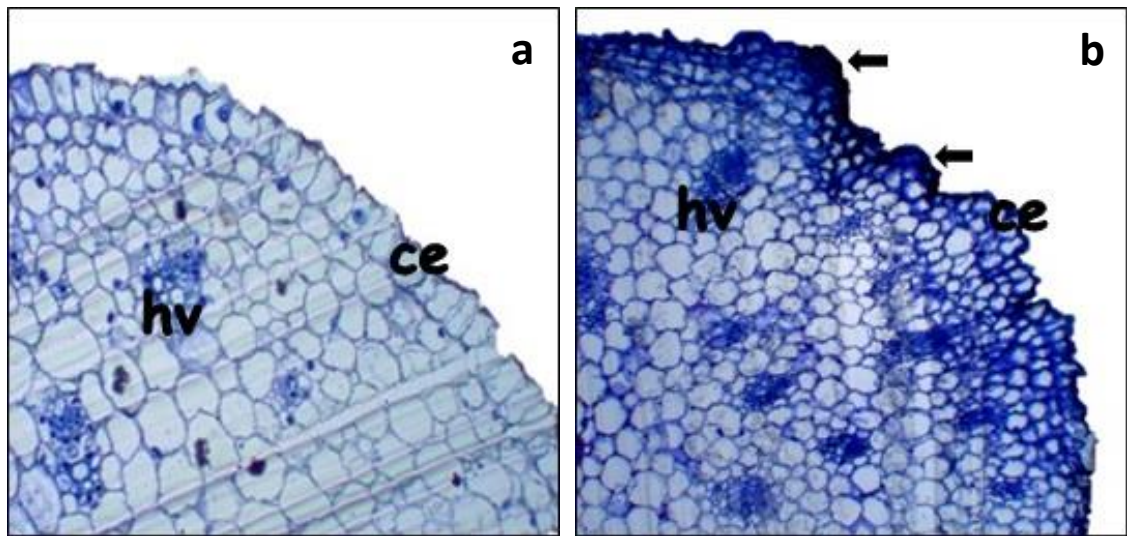


Figura 10. Cortes histológicos transversales en pecíolos de hojas de *Alstroemeria* ‘Sweet Laura’, cultivadas en medio de inducción suplementado con 1 mg L^{-1} de BAP. (ce=capa epidermal; hv=haces vasculares). (a) Estado original del pecíolo de hoja cultivada *in vitro* al día 0; (b) 7 días de cultivo *in vitro* en el medio de inducción (las flechas indican protuberancias originadas en la capa epidermal).

Transcurridos 20 días en el medio de inducción, se observó el desarrollo de brotes adventicios en los pecíolos (figura 6.b), lo que indicaría que dichos brotes se iniciaron a partir de células epidérmicas (figura 10.b), tal como señalan Lin *et al.* (1998), quienes durante el cultivo en medio de inducción, observaron que los explantes desarrollaron una estructura meristemática a partir de células epidérmicas, ubicadas al interior de la axila foliar, logrando desarrollar un primordio foliar.

Debido a que no encontraron yemas axilares o primordios foliares pre existentes, Nasri *et al.* (2013), señalan que brotes y yemas fueron regenerados de manera adventicia, inducidos desde células epidérmicas individuales ubicadas en el tejido axilar foliar. Por su parte, Pedraza-Santos *et al.* (2006) demuestran que los nuevos brotes formados, obtenidos desde inflorescencias inmaduras, corresponden a brotes adventicios originados desde tejidos internos del explante.

Eficiencia

De acuerdo con la prolificidad del explante (brotación/unidad de tiempo), se observó un desarrollo bastante eficiente, en comparación a estudios anteriores. La mayor inducción en explantes aéreos de *Alstroemeria* spp. se concentró dentro de la segunda semana desde iniciado el cultivo (figuras 11 y 12), para todos los tratamientos aplicados.

Los explantes obtenidos de *Alstroemeria caryophyllaea* que presentaron la mayor eficiencia de regeneración fueron aquellos cultivados con 1 mg L^{-1} de BAP. Se obtuvieron 4 brotes y 5 hojas como el máximo número de explantes regenerados, durante el transcurso de la segunda semana del cultivo *in vitro*. Los menores valores en los brotes se obtuvieron al ser cultivados sin suplementación de BAP, con 1 explante regenerado durante la segunda semana y durante la tercera semana de cultivo. Esta respuesta de regeneración también fue obtenida en las hojas cultivadas con 2 mg L^{-1} de BAP, mientras que para el caso de las hojas cultivadas en el medio suplementado con $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP y en aquellas cultivadas sin suplemento de BAP, no se logró organogénesis (figura 11).

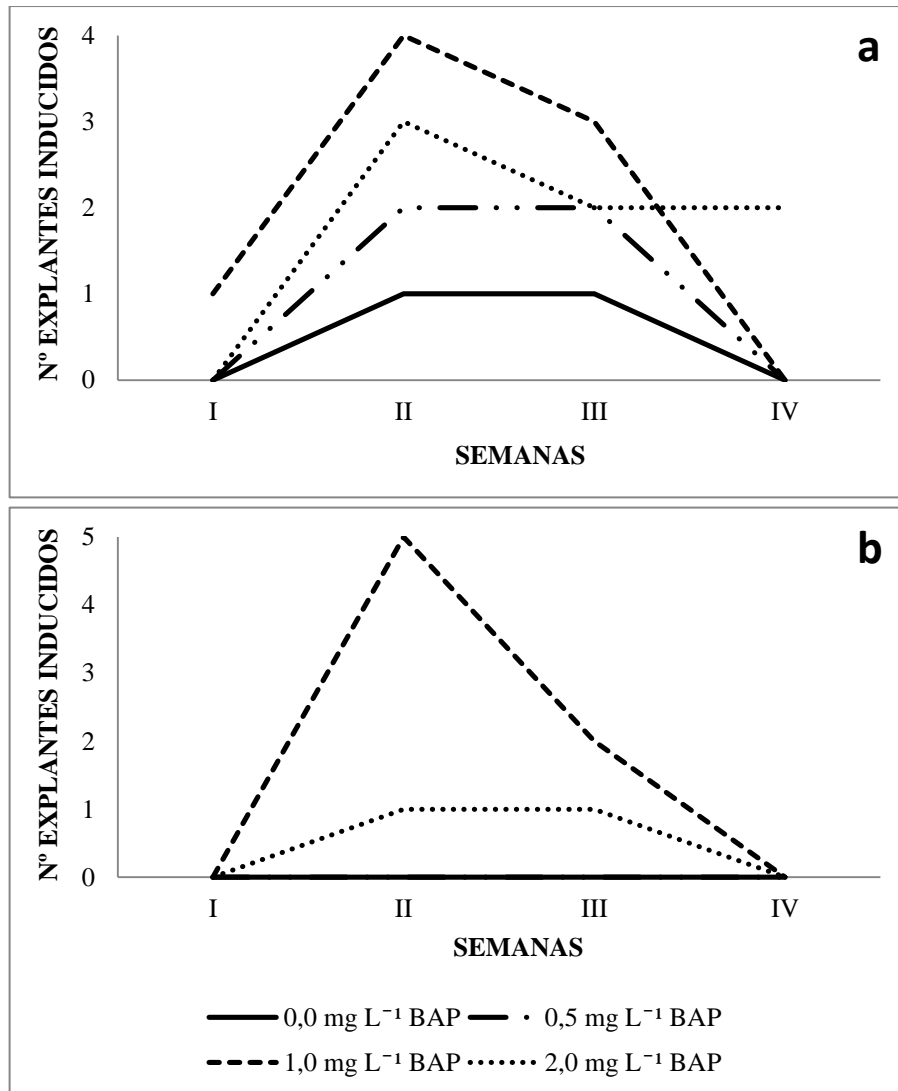


Figura 11. Eficiencia de regeneración evaluada en cultivo in vitro de explantes aéreos de *Alstroemeria caryophyllaea* aplicando cuatro tratamientos con BAP. (a) Brote; (b) hoja.

En los explantes obtenidos de *Alstroemeria* ‘Sweet Laura’ se logró la mayor eficiencia de regeneración en aquellos cultivados con 1 mg L⁻¹ de BAP, logrando 9, 4 y 5 explantes regenerados durante el transcurso de la segunda semana de cultivo, para el caso de brotes, hojas y tallos, respectivamente. El menor valor de regeneración se obtuvo durante la segunda semana de cultivo in vitro, con el suplemento de 2 mg L⁻¹ en hojas (1 explante regenerado) y tallos (2 explantes regenerados), mientras que en brotes se obtuvo 5 explantes regenerados con el medio sin suplementación de citoquinina (figura 12).

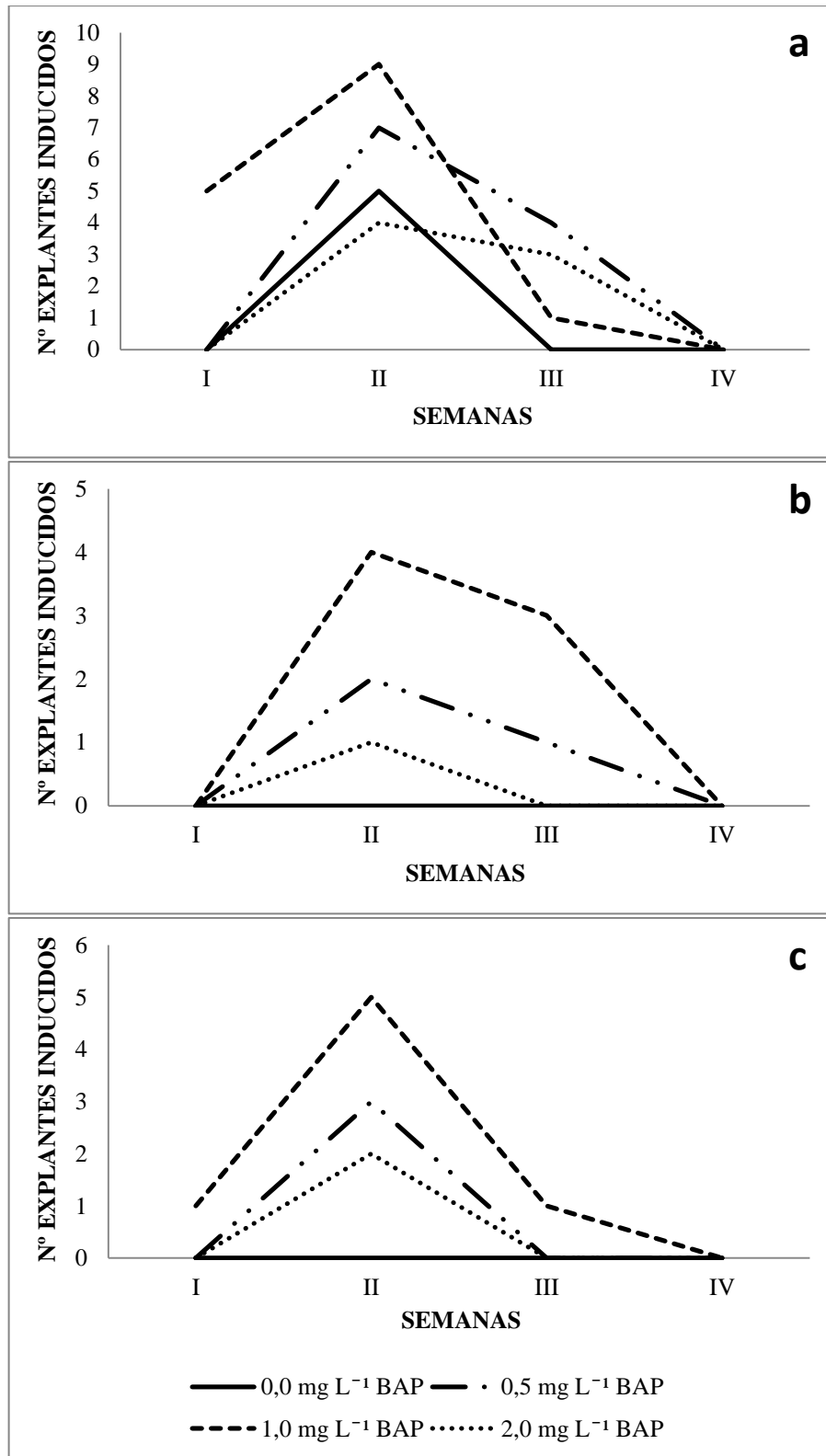


Figura 12. Eficiencia de regeneración evaluada en cultivo in vitro de explantes aéreos de *Alstroemeria* 'Sweet Laura' aplicando cuatro tratamientos con BAP. (a) Brote; (b) hoja; (c) tallo.

Aquellos explantes que lograron su inducción en la etapa 1, continuaron su regeneración en medio líquido con suplementación de 1 mg L^{-1} de BAP, y al finalizar su periodo de desarrollo se realizaron las mediciones cuantitativas (figura 13).

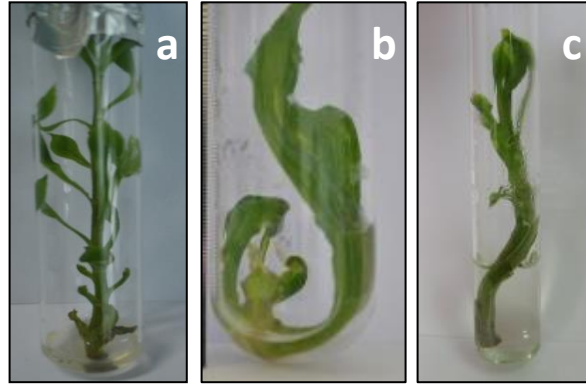


Figura 13. Respuesta de organogénesis directa a partir de explantes aéreos de *Alstroemeria* ‘Sweet Laura’. (a) Brote; (b) hoja; y (c) tallo, cultivados in vitro durante 90 días.

Todos aquellos explantes que lograron ser inducidos, presentaron la regeneración de un solo brote, lo que contrasta con otras investigaciones. Nasri *et al.* (2013), logran el desarrollo de 2,33 brotes adventicios por explante iniciado, cultivados durante ocho semanas, obteniendo este máximo resultado al ser suplementado con 1 mg L^{-1} de BAP y $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB. Mientras que Pedraza-Santos *et al.* (2006), lograron la mayor proliferación de brotes (2,7 brotes/explante) en 30 días, al suplementar con KIN ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) y BAP ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$), sugiriendo un aumento significativo al mantener los explantes en completa oscuridad y 8°C , al menos por 15 días. Hutchinson *et al.* (2010), señalan la suplementación con BAP (1 mg L^{-1}) y ANA ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$), o con TDZ ($0,09 \text{ mg L}^{-1}$), para obtener la mayor proliferación de brotes (7 brotes/explante). Por su parte, Lin *et al.* (1998) observan mayor capacidad organogénica en las hojas ubicadas más cercanas al ápice, por ser más jóvenes, desarrollando mayor porcentaje de regeneración (82,5%) y mayor número de brotes (4,5).

En cuanto a longitud y ancho de brotes, se obtiene la mayor respuesta al utilizar brotes como explantes (cuadros 6 y 7), siendo mayor y estadísticamente significativo para *A. ‘Sweet Laura’* que para *A. caryophyllaea*. En los brotes y las hojas de *Alstroemeria caryophyllaea* se obtuvo 1,23 cm y 0,09 cm de longitud, sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre sí. Mientras que en el caso de *Alstroemeria ‘Sweet Laura’* se alcanzó la mayor respuesta (3,59 cm) en los brotes y la menor longitud (0,29 cm) en las hojas, de manera estadísticamente significativa (cuadro 6).

Cuadro 6. Respuesta de la interacción entre los niveles del factor genotipo y del factor explante, evaluados en la variable longitud de brotes (cm) por explante cultivado (n=60).

GENOTIPO	EXPLANTE	LONGITUD BROTES		
		(cm)/EXPLANTE		
<i>Alstroemeria caryophyllaea</i>	Brote	1,23	a*	B**
	Hoja	0,085	ab	A
	Tallo	0	b	A
<i>Alstroemeria</i> 'Sweet Laura'	Brote	3,59	a	A
	Hoja	0,29	b	A
	Tallo	1,01	b	A

(*) Letras minúsculas iguales indican que no existen diferencias entre los distintos niveles de explante, evaluado dentro de cada nivel de genotipo.

(**) Letras mayúsculas iguales indican que no existen diferencias entre los distintos genotipos, para un mismo nivel de explante.

La suplementación de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, considerando TDZ (2,2 mg L), BAP (1 mg L) y ANA (0,1 mg L), aumenta significativamente la longitud en brotes (3,5 cm) de explantes obtenidos de *Alstroemeria aurantiaca* cv. Rosita (Hutchinson *et al.*, 2010). Las citoquininas provocan inducción de brotes, mediante la estimulación de división celular y la disminución de dominancia apical, lo que según Seyyedyousefi *et al.* (2013), explicaría que aumentos en la concentración de BAP causen la reducción en longitud de brotes.

El mayor ancho (0,18 cm) estadísticamente significativo, se obtuvo en los brotes de *Alstroemeria* 'Sweet Laura', mientras que con el mismo genotipo se observó en hojas y tallos el menor valor (0,03 cm). En *Alstroemeria caryophyllaea* se alcanzó 0,06 cm de ancho a partir de brotes, mientras que en hojas se logró 0,02 cm de ancho, sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre sí (cuadro 7).

Cuadro 7. Respuesta de la interacción entre los niveles del factor genotipo y del factor explante, evaluados en la variable ancho de brotes (cm) por explante cultivado (n=60).

GENOTIPO	EXPLANTE	ANCHO BROTES		
		(cm)/EXPLANTE		
<i>Alstroemeria caryophyllaea</i>	Brote	0,075	a*	B**
	Hoja	0,018	ab	A
	Tallo	0	b	A
<i>Alstroemeria</i> 'Sweet Laura'	Brote	0,177	a	A
	Hoja	0,032	b	A
	Tallo	0,033	b	A

(*) Letras minúsculas iguales indican que no existen diferencias entre los distintos niveles de explante, evaluado dentro de cada nivel de genotipo.

(**) Letras mayúsculas iguales indican que no existen diferencias entre los distintos genotipos, para un mismo nivel de explante.

El número de hojas que desarrolló cada explante no presentó interacción entre los factores evaluados, y por lo tanto se analizó cada factor por separado. Los explantes regenerados que fueron obtenidos de *Alstroemeria* 'Sweet Laura' lograron desarrollar mayor número de hojas (1,81) significativamente que al ser obtenidos de *Alstroemeria caryophyllaea* (0,88) (figura 14.a). Los brotes desarrollaron 3,24 hojas, superando significativamente las 0,63 y 0,17 hojas generadas en tallos y hojas, respectivamente (figura 14.b). En el caso de algunas hojas utilizadas como explante, lograron iniciar su regeneración pero durante el tiempo de cultivo no consiguieron completar el desarrollo de una nueva hoja.

De acuerdo a los cuatro tratamientos con BAP, se obtienen 4,13 hojas desarrolladas en el caso de aquellos explantes cultivados en medios suplementados con 1 mg L^{-1} de BAP, mientras que los explantes cultivados con 2 y $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP desarrollaron 1,83 y 1,52 respectivamente, en tanto que aquellos cultivados sin suplementación de citoquinina logran 0,58 hojas por explante (figura 14.c).

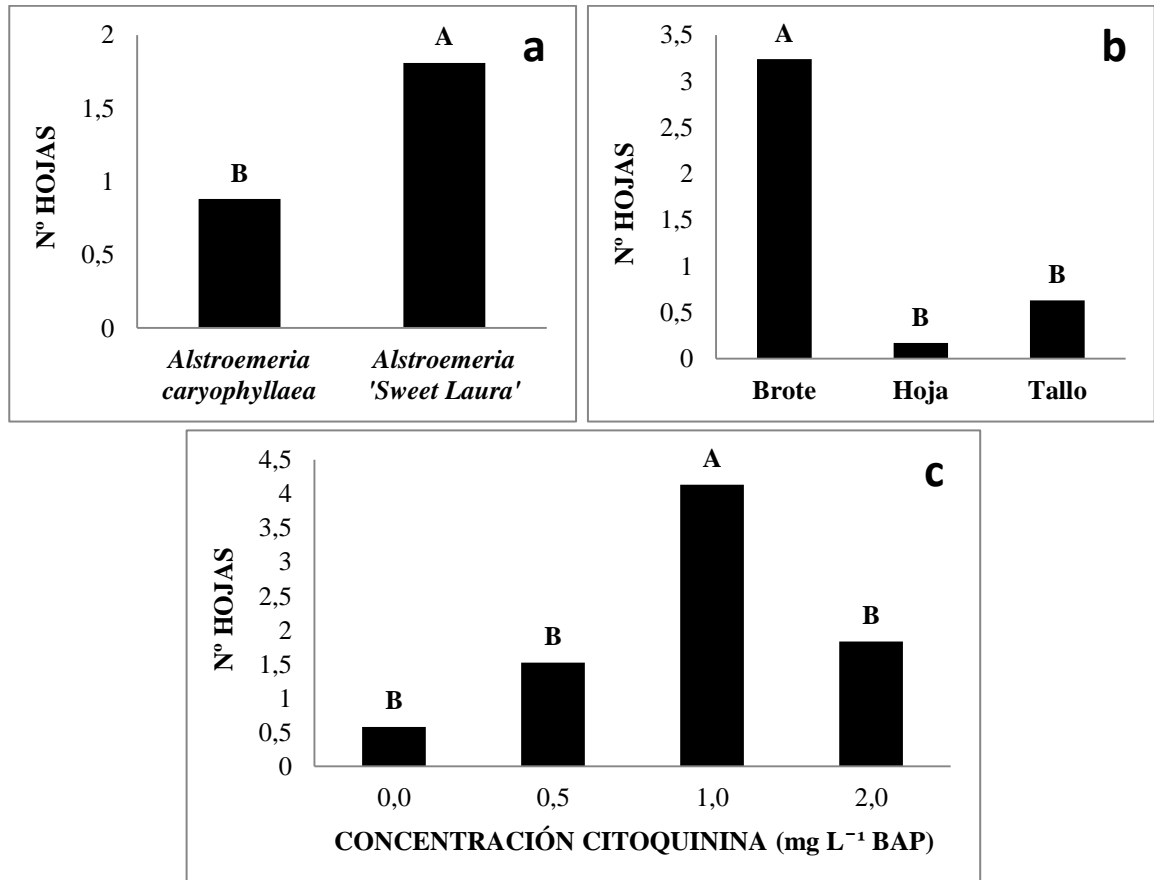


Figura 14. Efecto de los factores genotipo (a) (n=180); explante (b) (n=120); y concentración de citoquinina (c) (n=90), evaluados durante la regeneración de explantes aéreos de *Alstroemeria* spp. cultivados in vitro, sobre la variable número de hojas por explante. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Hutchinson *et al.* (2010), señalan que al combinar TDZ, BAP y ANA, los explantes obtenidos de *Alstroemeria aurantiaca* ‘Rosita’ logran formar 8 hojas. Mientras que Nasri *et al.* (2013), a partir de un híbrido de *Alstroemeria ligtu*, lograron obtener 7,33 y 10,66 hojas por explante cultivado durante 4 y 8 semanas, respectivamente, suplementando el medio con 1 mg L⁻¹ de BAP y 0,1 mg L⁻¹ de AIB. Estos datos son superiores a los obtenidos en la presente investigación, aunque es importante considerar el efecto que provoca el genotipo en la regeneración.

Los brotes regenerados de *Alstroemeria* ‘Sweet Laura’, logran una longitud significativamente mayor (1,617 cm) en sus hojas desarrolladas durante el cultivo, que al ser obtenidos de *Alstroemeria caryophyllaea* (0,647 cm). Se logra con esta variable, evidenciar nuevamente las diferencias entre dos genotipos pertenecientes a la misma especie. Entre brotes y hojas regeneradas, obtenidas de *A. caryophyllaea*, no se obtienen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la longitud de sus hojas formadas, pero en explantes obtenidos de *A. ‘Sweet Laura’*, son los brotes los que logran desarrollar mayor longitud en sus hojas (cuadro 8).

Cuadro 8. Respuesta de interacción entre los niveles del factor genotipo y del factor explante, evaluados en la variable longitud de hojas (cm) por explante cultivado (n=60).

GENOTIPO	EXPLANTE	LONGITUD HOJAS (cm)/EXPLANTE		
<i>Alstroemeria caryophyllaea</i>	Brote	0,647	a*	B**
	Hoja	0,228	a	A
	Tallo	0	a	A
<i>Alstroemeria</i> 'Sweet Laura'	Brote	1,617	a	A
	Hoja	0,295	b	A
	Tallo	0,725	b	A

(*) Letras minúsculas iguales indican que no existen diferencias entre los distintos niveles de explante, evaluado dentro de cada nivel de genotipo.

(**) Letras mayúsculas iguales indican que no existen diferencias entre los distintos genotipos, para un mismo nivel de explante.

Dentro del genotipo, al evaluar la longitud de hojas desarrolladas, no existen diferencias estadísticamente significativas entre brotes (0,647 cm) y hojas (0,228 cm) de *Alstroemeria caryophyllaea*, mientras que para *Alstroemeria* ‘Sweet Laura’ en las hojas desarrolladas, los brotes logran una longitud significativamente mayor (1,617 cm), que tallos (0,725 cm) y hojas (0,295 cm) usados como explantes (cuadro 8).

El ancho de hojas obtenido a partir de explantes de *Alstroemeria* ‘Sweet Laura’ es significativamente mayor al obtenido con *Alstroemeria caryophyllaea*, con 0,162 cm y 0,091 cm, respectivamente (figura 15.a). Al comparar específicamente entre explantes, la mayor respuesta significativamente obtenida es para el caso de brotes (0,273 cm). No se

obtiene diferencias estadísticamente significativas entre hojas (0,065 cm) y tallos (0,043 cm), aunque se debe considerar la nula regeneración en tallos provenientes desde *A. caryophyllaea* (figura 15.b). Al aplicar 1 mg L^{-1} de BAP en el medio de cultivo se consiguió el mayor ancho de hojas (0,241 cm), y para el caso de los tres tratamientos restantes con BAP, no se obtuvo diferencias significativas (figura 15.c).

Por otra parte, plantas cultivadas *ex vitro* presentan un tamaño de entre 1,5 a 4 cm de ancho y entre 2,5 a 8 cm de longitud para *Alstroemeria caryophyllaea*, y de entre 1 a 3 cm de ancho y entre 2 a 10 cm de longitud para *Alstroemeria* 'Sweet Laura', datos que difieren a la capacidad organogénica en explantes aéreos cultivados *in vitro*. Esto puede deberse a que plantas con comportamiento completamente autótrofo, a diferencia de las mantenidas *in vitro*, requieren una mayor superficie fotosintética que les permita autoabastecerse de nutrientes para su mantención y crecimiento.

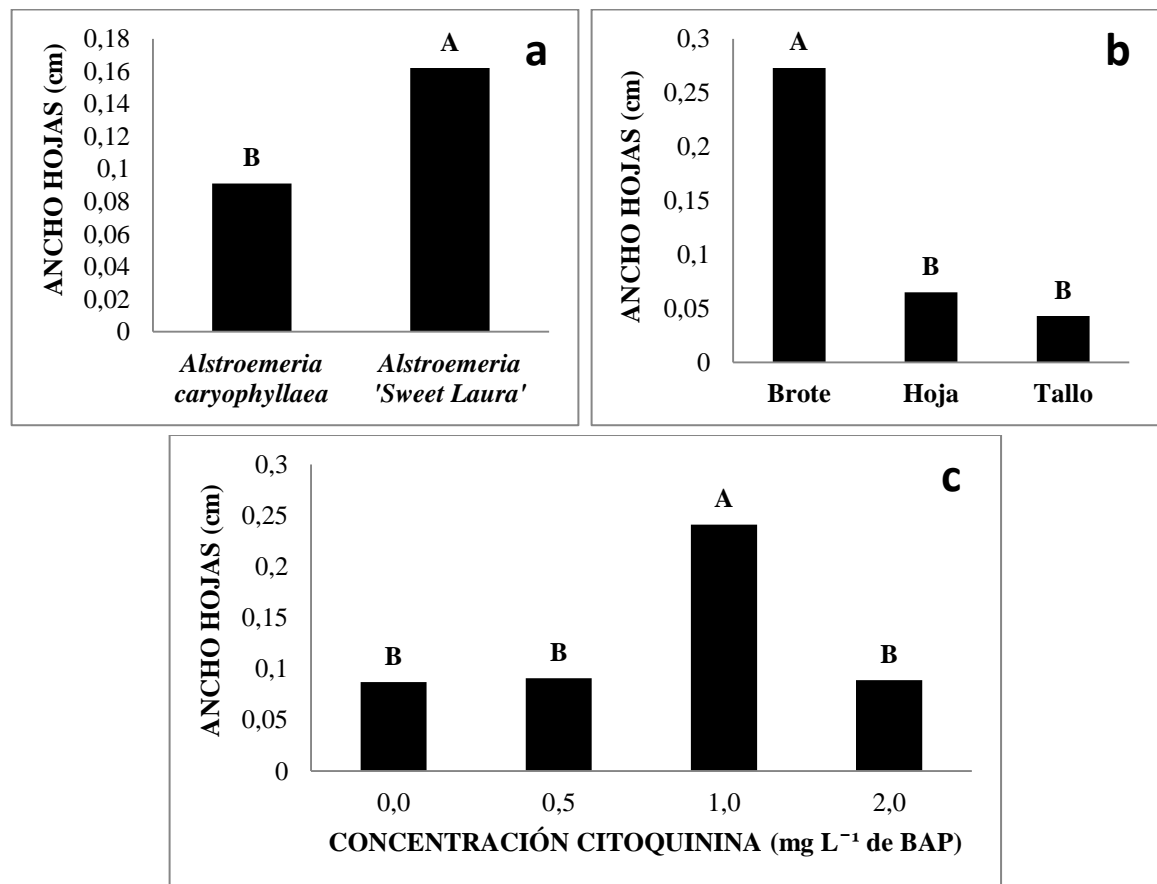


Figura 15. Efecto de los factores genotipo (a) (n=180), explante (b) (n=120), y concentración de citoquinina (c) (n=90), evaluados durante la regeneración de explantes aéreos en *Alstroemeria* spp. cultivados *in vitro*, sobre la variable ancho de hojas por explante. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

La suplementación del medio de cultivo con 1 mg L⁻¹ de BAP, en conjunto con la aplicación de 0,1 mg L⁻¹ de AIB, permitió obtener las mayores respuestas para las distintas variables evaluadas. Este resultado se sustenta con los dichos de Hutchinson *et al.* (2010), quienes indican que las respuestas morfogénicas están moduladas por el balance e interacción entre las fitohormonas, con particular importancia en auxinas y citoquininas (Ongaro and Leyser, 2008), y al igual que lo señalado por Nasri *et al.* (2013), se obtiene la proporción 10:1 respecto a aplicaciones de BAP y AIB, con 1 mg L⁻¹ de BAP, como la más beneficiosa para lograr el máximo número y longitud en brotes y hojas.

Ambos genotipos analizados, *A. caryophyllaea* y *A. 'Sweet Laura'*, generaron respuestas bastante similares entre sí, aunque siempre *A. 'Sweet Laura'* obtuvo las más altas respuestas en cuanto a la inducción y regeneración de los explantes. De acuerdo con Buitendijk *et al.* (1992), Lu and Bridgen (1996) y Hoshino (2008), quienes mencionan que se ha determinado que el genotipo de la especie a propagar afecta el desarrollo in vitro de los explantes, demostrando que no todos los cultivares de *Alstroemeria* desarrollan igual regeneración ni obtienen la misma tasa de propagación. Por lo tanto, las diferencias observadas pueden ser debido al genotipo, considerando que *Alstroemeria caryophyllaea* es una especie nativa que no permite su completo establecimiento ni domesticación, a diferencia de *Alstroemeria 'Sweet Laura'* que es obtenida por mejoramiento genético y presenta estabilidad en condiciones de cultivo controlado.

En el caso de brotes y hojas utilizados como explantes, para ambos genotipos se obtienen resultados similares, aunque se encuentra variación con respecto a la organogénesis en tallos de *A. 'Sweet Laura'*. Lo que concuerda con Chiari and Bridgen (2000) y Pumisitapon *et al.* (2011), quienes señalan que al utilizar el mismo tejido se ha observado un comportamiento de regeneración similar entre distintos genotipos

En suma, mediante el cultivo in vitro realizado a partir de explantes aéreos de *Alstroemeria caryophyllaea* y *Alstroemeria 'Sweet Laura'*, para evaluar organogénesis directa en función de distintas condiciones de suplemento con BAP, se logra afirmar la hipótesis establecida. Es decir, es posible señalar que los brotes utilizados como explantes generan mayor efectividad y eficiencia para desarrollar organogénesis directa.

A partir de estos resultados es posible expandir las posibilidades de cultivo y propagación clonal eficiente para *Alstroemeria* spp.

CONCLUSIONES

No se genera contaminación al interior de las placas cultivadas in vitro, por lo tanto la desinfección aplicada fue exitosa.

Durante el periodo de inducción, los brotes lograron un desarrollo evidentemente superior en comparación al resto de los explantes, probablemente debido a que el brote poseía sus meristemas diferenciados en el momento de iniciar el cultivo in vitro, pero también puede deberse a la estimulación provocada por los reguladores de crecimiento, específicamente por citoquininas (BAP). Para el caso de hojas y tallos, en que no se obtuvo una clara respuesta, podría deberse a que el suministro de reguladores de crecimiento no fue óptimo para provocar el tipo de estímulo necesario que promoviera de manera efectiva su desarrollo, pero también a la dependencia genotípica.

La regeneración de los explantes obtenidos desde ambos genotipos se concentró durante la segunda semana de cultivo, hecho que demuestra la eficiencia del uso de cultivo in vitro, y más aún, de la suplementación de BAP, lo que permitiría acelerar en aplicaciones futuras el proceso de crecimiento y desarrollo de plantas, específicamente a partir de *Alstroemeria caryophyllaea* y 'Sweet Laura'.

A partir de los explantes cultivados en el medio suplementado con 1 mg L^{-1} de BAP, se obtuvo la mayor respuesta en organogénesis directa para ambos genotipos. Este resultado es específicamente mayor en los brotes utilizados como explantes, aunque en hojas y tallos también se obtienen importantes respuestas. Por lo tanto es posible concluir la presente investigación con un protocolo que permite desarrollar regeneración directa a partir de explantes aéreos en *Alstroemeria* spp.

Se propone para estudios futuros, la evaluación de organogénesis directa bajo condiciones de oscuridad, considerando los resultados obtenidos en otras especies de alstroemeria. Además de la continuación del procedimiento de propagación, específicamente de las etapas de multiplicación, enraizamiento, y aclimatación, para concretar la posibilidad de obtener una planta a partir de explantes aéreos en *Alstroemeria* spp.

Considerando el éxito de la investigación, se propone su aplicación como técnica de micropropagación para *Alstroemeria caryophyllaea* y 'Sweet Laura', en combinación con diversos métodos de mejoramiento genético y de propagación clonal.

LITERATURA CITADA

- Aros, D.; V. González; R.K. Alleman; C.T. Müller; C. Rosati and H.J. Rogers. 2012. Volatile emissions of scented *Alstroemeria* genotypes are dominated by terpenes, and a myrcene synthase gene is highly expressed in scented *Alstroemeria* flowers. *Journal of Experimental Botany*, 63(7): 2739-2752.
- Assis, M.C. 2004. *Alstroemeriaceae* no estado do Rio de Janeiro. *Rodriguésia*, 55(85): 5-15.
- Azcón-Bieto, J. y M. Talón. 2008. Fundamentos de fisiología vegetal. 2ª ed. Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana. 650p.
- Bayer, E. 1987. Die gattung *Alstroemeria* in Chile. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München*, 24: 79-83.
- Bridgen, M.; E. Kollman and C. Lu. 2009. Interspecific hybridization of *Alstroemeria* for the development of new, ornamental plants. *Acta Horticulturae*, 836: 73-78.
- Buitendijk, J.H.; M.S. Ramanna and E. Jacobsen. 1992. Micropropagation ability: towards a selection criterion in *Alstroemeria* breeding. *Acta Horticulturae*, 325: 493-498.
- Chiari, A. and M.P. Bridgen. 2000. Rhizome splitting: a new micropropagation technique to increase in vitro propagule yield in *Alstroemeria*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62: 39-46.
- Cruz, I.; A. Angarita and T. Mosquera. 2003. Induction of somatic embryogenesis in *Alstroemeria* spp. *Agronomía Colombiana*, 21(3): 121-128.
- Foster, M.B. 1945. *Alstroemeria caryophylleae*. *Herbertia*, 12: 44-48.
- George, E.F.; M.A. Hall and G.J. De Klerk. 2008. Plant propagation by tissue culture. 3rd ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer. 501p.
- Hoshino, Y. 2008. Advances in *Alstroemeria* biotechnology. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, 5: 540-546.

Hutchinson, M.J.; R. Onamu; L. Kipkosgei and S.D. Obukosia. 2010. Effect of thidiazuron, NAA and BAP on in vitro propagation of *Alstroemeria aurantiaca* cv. 'Rosita' from shoot tip explants. *The Journal of Agriculture, Science and Technology*, 12(2): 60-69.

Jacquin, N. 1804. *Alstroemeria caryophyllaea* Jacq. *Plantarum Rariorum Horti Caesarei Schoenbrunnensis*, 4: 33.

Khaleghi, A.; A. Khalighi; A. Sahraroo; M. Karimi; A. Rasoulnia; I.N. Ghafoori. *et al.* 2008. In vitro propagation of *Alstroemeria* cv. 'Fuego'. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 3(3): 492-497.

Kim, J.B.; C.J.J. Raemakers; E. Jacobsen and R.G.F. Visser. 2006. Efficient somatic embryogenesis in *Alstroemeria*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86: 233-238.

Lim, S.; S. Lee; S. Kang and J. Kim. 2012. *Alstroemeria* plants and its biotechnological applications. *Journal of Plant Biotechnology*, 39: 219-224.

Lin, H.S.; M.J. De Jeu and E. Jacobsen. 1997. Direct shoot regeneration from excised leaf explants of in vitro grown seedlings of *Alstroemeria* L. *Plant Cell Reports*, 16: 770-774.

Lin, H.S.; M.J. De Jeu and E. Jacobsen. 1998. Formation of shoots from leaf axils of *Alstroemeria*: The effect of the position on the stem. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52: 165-169.

Lin, H.S.; C. Van Der Toorn; K.J.J.M. Raemakers; R.G.F. Visser; M.J. De Jeu and E. Jacobsen. 2000. Development of a plant regeneration system based on friable embryogenic callus in the ornamental *Alstroemeria*. *Plant Cell Reports*, 19: 529-534.

Muñoz, M. y A. Moreira. 2003. *Alstroemerias de Chile*. Santiago, Chile: Taller La Era. 140p.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologiae Plantarum*, 15: 473.

Nasri F.; S.N. Mortaza Vi; N. Ghaderi and T. Javadi. 2013. Propagation in vitro of *Alstroemeria ligtu* hybrid through direct organogenesis from leaf base. *Journal of Horticultural Research*, 21(2): 23-30.

Ongaro, V. and O. Leyser. 2008. Hormonal control of shoot branching. *Journal of Experimental Botany*, 59(1): 67-74.

Pedraza-Santos, M.E.; M.C. López-Peralta; V.A. González-Hernández; E.M Engleman-Clark and P. Sánchez-García. 2006. In vitro regeneration of *Alstroemeria* cv. 'Yellow King' by direct organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84: 189-198.

Prat, L.; C. Botti and T. Fichet. 2008. Effect of plant growth regulators on floral differentiation and seed production in Jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider). *Industrial Crops and Products*, 27: 44-49.

Pumisutapon, P.; R.G.F. Visser and G.J. De Klerk. 2011. Hormonal control of the outgrowth of axillary buds in *Alstroemeria* cultured in vitro. *Biologia Plantarum*, 55(4): 664-668.

Shahriari, A.G.; A. Bagheri and Z. Shahriari. 2014. In vitro regeneration of *Alstroemeria*: a review. (cap. 13, pp. 270-282). In: Ramawat, K.G and J.M. (Eds.) Mérillon. Bulbous plants biotechnology. Florida, USA: CRC Press. 283p.

Seyyedyousefi, S.R.; B. Kaviani and N.P. Dehkaei. 2013. The effect of different concentrations of NAA and BAP on micropropagation of *Alstroemeria*. *European Journal of Experimental Biology*, 3(5): 133-136.

Van Zaayen, A. 1995. Virus and Virus-like diseases of bulb and flower crops. West Sussex, UK: Wiley publishers.

Yousef, H.; B. Sahar and H. Abdollah. 2007. In vitro propagation of *Alstroemeria* using rhizome explants derived in vitro and in plot plants. *African Journal of Biotechnology*, 6(18): 2147-2149.

ANEXOS

Anexo 1: Medio Basal Murashige y Skoog (*)

Stock	Compuesto	Cantidad en Solución Final (mg L ⁻¹)
I	NH ₄ NO ₃	1650,0
	KNO ₃	1900,0
	KH ₂ PO ₄	170,0
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370,0
	(ó MgSO ₄ ·6H ₂ O)	(ó 342,97)
II	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440,0
III	Na ₂ EDTA	37,3
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8
IV	H ₃ BO ₃	6,2
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3
	(ó MnSO ₄ ·H ₂ O)	(ó 16,9)
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6
	KI	0,83
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
	CoSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
Vitaminas		
V	Myo-inositol	100,0
	Glycina (aminoácido)	2,0
	Ácido nicotínico (Niacina-B ₃)	0,5
	Pyridoxina-HCl B ₆	0,5
	Tiamina-HCl B ₁	0,1

*Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologiae Plantarum*, 15: 473.

Anexo 2: Preparación de Muestras Histológicas (Prat *et al.*, 2008)

Fijación de Muestras

Una vez seleccionados los explantes para realizar su muestra histológica, deben mantenerse en solución de Formalina:Ácido acético glacial:Alcohol (F.A.A. 5:5:90 v/v) hasta el momento de realizar el proceso para su corte.

Deshidratación de Muestras

Cada muestra debe ser sumergida en tres soluciones de etanol, concentrado en 70, 80 y 90 % v/v, sucesivamente, durante 30 minutos para cada caso.

Infiltración en plástico JB4

Una vez fijada, la muestra debe ser mantenida en una solución que contenga 0,225 g del catalizador C (Benzoyl Peroxide 70% humedecido con agua), por cada 25 cc de la solución A (Acrylic Monomer, n-Butoxyethanol), durante un tiempo mínimo de 3 horas y máximo de 16 horas.

Inclusión en cápsulas de Beem

Una vez transcurrido el tiempo determinado para la infiltración, la muestra debe ser mantenida en cápsulas, dentro de las cuales se vierte una mezcla que contenga 1 cc de la solución B (N,N-Dimethylaniline, Polyethylene Glycol) por cada 25 cc del compuesto A, además del compuesto A y del catalizador C en igual concentración a las indicadas anteriormente.

Corte de Muestras

Mediante el uso de un micrótopo se realiza el corte de cada muestra de manera de dejar la zona de interés expuesta para obtener un análisis preciso. Cada corte se debe depositar sobre una gota de agua ubicada en un portaobjeto, de manera q el corte quede estirado y fijado para su posterior tinción.

Tinción de Muestras

Una vez obtenidos las muestras, ya secas sobre el portaobjeto, se realiza tinción para su estudio bajo microscopía óptica. Este proceso consta de realizar la inmersión del portaobjeto, con las muestras añadidas en él, en distintas soluciones acuosas durante un tiempo específico cada uno, especificado a continuación:

1. Inmersión en Ácido Periódico (0,5%) durante 10 minutos, y posterior enjuague con agua corriente durante 10 minutos.
2. Inmersión en Reactivo de Schiff durante 10 minutos, y posterior enjuague con agua corriente durante 10 minutos.
3. Inmersión en Bisulfito de Sodio (2%) durante 2 minutos, y posterior enjuague con agua corriente durante 10 minutos.
4. Inmersión en Azul de Toluidina (0,5%) durante 3 minutos, y posterior enjuague con agua corriente hasta que deje de salir colorante desde las placas.

Finalmente, se dejan secar a temperatura ambiente y se sellan aplicando una gota de bálsamo de Canadá para adherir el cubre objeto.

APÉNDICES

Apéndice 1: Ensayo Previo de Desinfección de Explantes

Se evaluaron cinco tipos de desinfección para el material vegetal, detallados a continuación:

1. Un enjuague con etanol (10%) durante 30 segundos, y posteriormente la inmersión de los explantes en 15% (v/v) de cloro comercial (5% ingrediente activo) durante 10 minutos, para finalizar con 3 enjuagues de agua destilada estéril.
2. Un enjuague con etanol (10%) durante 30 segundos, y posteriormente la inmersión de los explantes en 20% (v/v) de cloro comercial durante 10 minutos, para finalizar con 3 enjuagues de agua destilada estéril.
3. Inmersión de los explantes en cloro (15%), combinado con unas gotas de tween 20, durante 15 minutos, y luego 3 enjuagues con agua destilada estéril.
4. Inmersión de los explantes en cloro (15%), combinado con unas gotas de tween 20, durante 20 minutos, y luego 3 enjuagues con agua destilada estéril.
5. Enjuague simple de explantes con unas gotas de tween 20 en agua destilada, y luego con una mezcla de benlate más captan (0,7:0,3 v/v). Posteriormente, se realizó la inmersión de los explantes en cloro (1%) durante 10 minutos, para luego mantener en agua destilada durante 24 horas. Finalmente, se dejaron en una solución de cloro (0,5%) durante 10 minutos, aplicando un enjuague doble con agua destilada autoclavada.

Con posterioridad a la desinfección, los explantes fueron cultivados en condiciones estériles en placas Petri conteniendo medio MS. Los cultivos fueron mantenidos en una cámara de crecimiento con temperatura de 20 ± 1 °C, y con fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad. Se realizaron observaciones semanalmente para evaluar la aplicación de los distintos tratamientos.

En la primera etapa de desinfección, luego de aplicar los cuatro tratamientos, se observó un 100% de éxito con la aplicación de 15% (v/v) de cloro comercial (5% ingrediente activo) durante 15 minutos, resultado superior a los obtenidos por Pedraza-Santos *et al.* (2006). Para el caso de las desinfecciones con etanol, se observó clorosis en los tejidos, y en la desinfección con 20% (v/v) de cloro comercial (5% ingrediente activo) durante 15 minutos

se obtuvo 60% de éxito. Mientras que, con el tratamiento más extenso se obtuvo clorosis en el 70% de los explantes tratados, presentando debilidad en el tejido foliar de aquellos explantes que respondieron efectivamente al tratamiento.

De acuerdo con los resultados obtenidos, es posible señalar que el uso de etanol en conjunto al cloro comercial es evidentemente excesivo. Sumergir los explantes en una solución con cloro al 15% (v/v) fue suficiente para lograr una óptima desinfección de material vegetal, que por ser aéreo claramente el contenido de patógenos es menor que el presente en material en contacto con sustrato, por ejemplo.

Apéndice 2: Preparación de Medios para Cultivo in vitro

Pasos Previos

- Calibrar pHmetro con soluciones buffer a temperatura ambiente.
- Verificar conductividad eléctrica de agua destilada ($CE < 4 \mu\text{S/m}$), en caso de ser necesario.
- Definir medios y cantidad total requerida.
- Calcular peso y volúmenes de cada componente.

Preparación de 1 litro de Medio

- 1- Verter 800 ml (cantidad aproximada) de agua destilada en botella autoclavable.
- 2- Agregar medio 4,43 g MS (Murashige y Skoog, 1962).
- 3- Agregar 30 g sacarosa.
4. Agregar reguladores de crecimiento y otros (opcional).
5. Aforar a 1000 ml con agua destilada.
6. Disolver con agitador magnético.
7. Ajustar pH a 5,8 con NaOH o HCl 1N, según se requiera.
8. Agregar 7 gr de agar (opcional: medio gelificado).
9. Calentar en microondas y disolver en agitador magnético hasta lograr total dilución (inicio de ebullición, y apariencia transparente y homogénea).
10. Dispensar en contenedor en los que se desarrollará el cultivo.
11. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Apéndice 3: Protocolo de Regeneración in vitro para *Alstroemeria* spp. (*A. caryophyllaea* y *A. 'Sweet Laura'*) a partir de explantes aéreos

Desinfección de Explantes

Los explantes se deben mantener en una solución 15% v/v de cloro comercial (6% ingrediente activo) en constante agitación, durante 15 minutos. Posteriormente, se deben enjuagar tres veces con agua destilada estéril, durante 3 minutos cada vez.

Medio de Inducción

El cultivo de cada explante se debe realizar en medio MS (Murashige and Skoog, 1962), conteniendo 30 g L⁻¹ de sacarosa y 7 g L⁻¹ de agar, siendo suplementado con 0,1 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) y 1 mg L⁻¹ de bencilaminopurina (BAP), ajustando el pH en 5,8 ± 1. Dicho medio debe ser esterilizado previo a su uso, durante 15 minutos a 121°C.

Las mantención de los explantes in vitro debe ser en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas, con fotoperiodo regulado en 16/8 horas luz/oscuridad y temperatura de 20 ± 1 °C.

Medio de Regeneración

Los explantes que presentan signos de brotación, considerando cambios de forma (protuberancias de 1 mm) y/o de color (blanquecino o cremoso), se deben traspasar a un segundo medio de cultivo, estéril previo uso, para continuar su regeneración. Siendo desarrollados en cultivo líquido conteniendo medio MS, 30 g L⁻¹ de sacarosa, y suplementado con 2,0 mg L⁻¹ de BAP, ajustando el pH en 5,8 ± 1.

Las mantención de los explantes in vitro debe ser en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas, con fotoperiodo regulado en 16/8 horas luz/oscuridad y temperatura de 20 ± 1 °C.