

## La luz promueve la bulbificación *in vitro* de *Sprekelia formosissima*

Agustín Uribe-Treviño<sup>1</sup>  
Martha Elena Pedraza-Santos<sup>1,5</sup>  
Patricia Delgado-Valerio<sup>1</sup>  
Alejandro Martínez-Palacios<sup>2</sup>  
Juan Carlos González-Hernández<sup>3</sup>  
Pedro Antonio-López<sup>4</sup>

1 Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Paseo Lázaro Cárdenas 2290, Emiliano Zapata, Uruapan, Michoacán, México. CP. 60170. (agustin.uribe@umich.mx; dvalerio@umich.mx).

2 Instituto de Investigaciones Pecuarias y Forestales-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Carretera Morelia-Zinapécuaro km 9.5, Tarímbaro, Michoacán, México. CP. 58030. (alejandro.palacios@umich.mx).

3 Instituto Tecnológico de Morelia-Tecnológico Nacional de México. Av. Tecnológico 1500, Lomas de Santiaguillo, Morelia, Michoacán, México. CP. 58120. (juan.gh@morelia.tecnm.mx).

4 Colegio de Postgraduados-Campus Puebla. Carretera México-Puebla km 125.5, Santiago Momoxpan, San Pedro Cholula, Puebla, México. CP. 72760. (palopez@colpos.mx).

Autor para correspondencia: martha.elena.pedraza@umich.mx.

### Resumen

*Sprekelia formosissima* es una geófito ornamental que se propaga por división de bulbos ya que su obtención por semilla lleva hasta cuatro años. La micropropagación es una opción para producir bulbos que crecen y acumulan carbohidratos de manera diferenciada bajo distintas condiciones de luz y en función de la especie. En 2022, se evaluó el crecimiento *in vitro* de bulbos de *S. formosissima* con 0, 30, 60, 120 y 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz. Los bulbos se cultivaron en medio MS con 4% de sacarosa y fotoperiodo de 16 h. A los 80 días se midió número, color, clorofila y longitud de hojas, peso fresco y seco de hojas y bulbos, ancho y largo de bulbos. Se midieron los azúcares solubles totales, azúcares reductores, sacarosa, fructosa en hojas y además almidón en bulbos. Para determinar almidón se probaron 4 y 8 U de amiloglucosidasa y  $\alpha$ -amilasa con 6, 12 y 24 h de digestión. Con los datos se realizó un ANDEVA y la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). Con 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  aumentó el peso fresco, seco y diámetro de bulbo, número de hojas, almidón en bulbos, clorofila a, b y total en 152, 433, 44, 87 y 251% y 55, 35 y 58 veces, respectivamente, en comparación con los datos registrados en la oscuridad. La intensidad alta de luz *in vitro* incrementa la biomasa y almidón en bulbos de *S. formosissima* que se estimó con 8 U de amiloglucosidasa y  $\alpha$ -amilasa y 24 h de digestión.

### Palabras clave:

carbohidratos, intensidad de luz, micropropagación de geófitas.



License (open-access): Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una licencia **Creative Commons**

## Introducción

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

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

La propagación tradicional de *Sprekelia formosissima* es por división de bulbos, ya que obtener plantas con flores a partir de semilla puede llevar hasta cuatro años (Borys *et al.*, 2005), además la propagación vegetativa es limitada a la producción de uno o ningún brote por año. Por esto, las técnicas de propagación *in vitro* son una alternativa para la propagación masiva de esta especie en la que se pueden obtener hasta 96 bulbillos en seis meses a partir de un solo bulbo (Cázar *et al.*, 2010).

Sin embargo, el reto en la micropropagación de esta especie es la bulbificación (formación y crecimiento de bulbos), ya que los bulbillos producidos *in vitro* que crecen lo suficiente, logran un estado de desarrollo adulto, brotan rápido y forman tallos, hojas y flores; por el contrario, los bulbos de menor tamaño pasan por un estado juvenil, que en el caso de lilis forman únicamente hojas en roseta sin producir flores (De Klerk, 2012).

El crecimiento de la planta posterior a la brotación está relacionado con la acumulación de almidón y azúcares solubles como sacarosa, glucosa y fructosa, durante la bulbificación (Podwyszynska, 2012). La acumulación de carbohidratos en bulbos ornamentales puede ser afectada por las variables ambientales de incubación como la luz (intensidad, calidad y fotoperiodo), que modula el crecimiento y desarrollo de las plantas cultivadas *in vitro* (Yang *et al.*, 2018).

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

Asimismo, la oscuridad inhibió completamente la formación de bulbos en *Eucomis zambesiaca* y el fotoperiodo de 8 horas de luz promovió su formación (Cheesman *et al.*, 2010). Por el contrario, en *Hyacinthus orientalis* (Kim *et al.*, 1981) y *Lilium longiflorum* (Kumar *et al.*, 2006) se reportó un número de brotes mayor en condiciones de oscuridad. Estos datos muestran que los efectos de la luz y la oscuridad en la producción *in vitro* de bulbos en las plantas geófitas deben ser estudiados en cada especie para determinar las condiciones óptimas para la producción de bulbos de calidad.

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de la intensidad de luz sobre 1) el crecimiento *in vitro* de bulbos de *Sprekelia formosissima* y 2) la concentración de almidón, azúcares solubles totales, azúcares reductores, sacarosa y fructosa en los bulbos.



## Materiales y métodos

### Material vegetal

Las semillas de *Sprekelia formosissima* se colectaron en la localidad de Tejerías en Uruapan, Michoacán (19° 23' 89" N y 102° 00' 22.82" O). Éstas se sumergieron en solución con 1 mg L<sup>-1</sup> de Tecto® (tiabendazol 60%) y 60 gotas de Microdin® (plata ionizada 0.35%) por 15 minutos; luego se enjuagaron tres veces con agua estéril. La desinfección se efectuó con una solución de hipoclorito de sodio (2.1%) durante 15 minutos y tres enjuagues con agua estéril. Después, las semillas se germinaron en medio Murashige y Skoog (1962) con 100 mg L<sup>-1</sup> mioinositol, 0.4 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 6 g L<sup>-1</sup> de agar (medio basal) más 3% de sacarosa.

El pH del medio se ajustó a 5.8, la incubación de los cultivos fue a 25 °C, con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad y radiación fotosintéticamente activa de 60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, con lámparas de luz fluorescente blanca de 75 W. Las plántulas con bulbillos se obtuvieron a las ocho semanas.

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

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

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

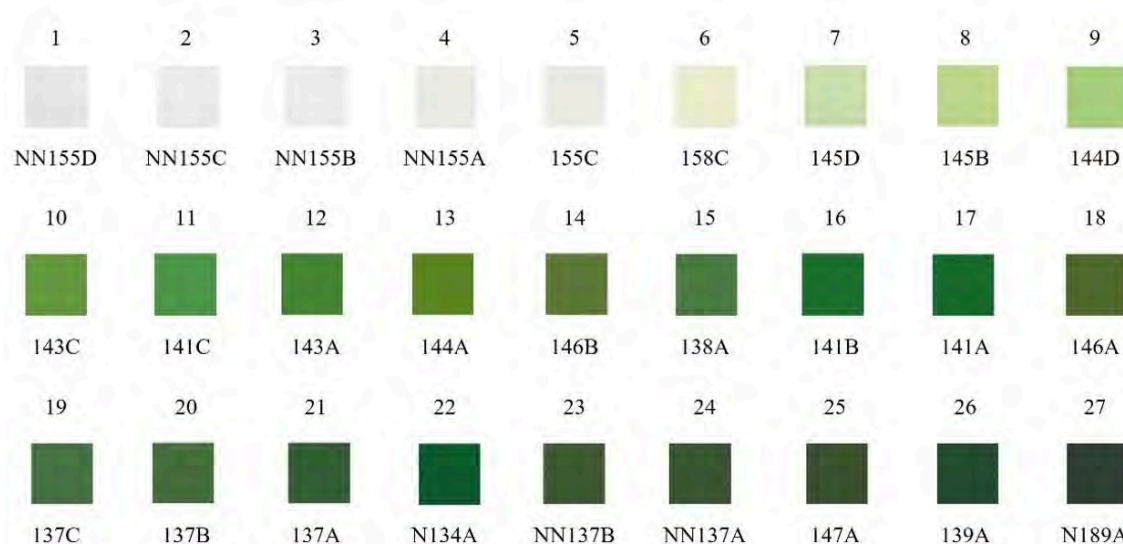
A los 80 días después de establecido el experimento (dde), en las hojas se evaluó la concentración de clorofila, color, número y longitud de la hoja más larga. En bulbos se midió ancho, longitud y contenido de almidón. En bulbos y hojas se registró peso fresco, peso seco y contenido de carbohidratos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

Para medir clorofila, las hojas se colocaron en 5 ml de N, N dimetilformamida en oscuridad por 72 horas a 4 °C, después se tomó 1 ml del solvente y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Jenway 6305) a 664 y 647 nm (Porra *et al.*, 1989), con estos datos y las funciones clorofila a= 12.70(A<sub>664</sub>)-2.79(A<sub>647</sub>), clorofila b= 20.70(A<sub>647</sub>)-4.62(A<sub>664</sub>) y clorofila total= 17.90(A<sub>647</sub>) - 8.08(A<sub>664</sub>) se calculó la concentración de clorofila en mg L<sup>-1</sup> y con el peso de muestra, en mg g<sup>-1</sup> peso fresco.

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



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



Para determinar los carbohidratos solubles se utilizó una muestra de aproximadamente 50 mg de tejido pulverizado congelado, a la que se adicionaron 500 µl de etanol 80%, luego la muestra se calentó a 80 °C por 30 minutos con agitación cada 10 minutos y se centrifugó a 13 000 rpm por 10 minutos para separar y recuperar el sobrenadante del sedimento, este procedimiento se repitió tres veces a partir de la adición del etanol 80%.

A partir del sobrenadante, los azúcares solubles totales se determinaron por el método de fenol - ácido sulfúrico (Rover *et al.*, 2013), azúcares reductores por Somogyi-Nelson (Maldonade *et al.*, 2013) y sacarosa y fructosa por el método propuesto por Seliwanoff (Quesada, 2007). La determinación de clorofila se realizó con tres repeticiones por tratamiento, los carbohidratos no estructurales con cuatro, número y longitud de hoja más larga con diez y para el resto de las variables se midieron siete repeticiones por tratamiento.

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

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

Después de lavar con etanol 80% el sedimento se secó a 80 °C y se agregaron 200 µl de agua destilada estéril, la muestra se calentó a 95 °C por 45 minutos para gelatinizar el almidón y luego se agregaron 300 µl de una solución buffer de acetato de sodio 0.2 M (pH 5.4) que contenía α-amilasa de *Bacillus licheniformis* (EC 3.2.1.1) y amiloglucidasa de *Aspergillus niger* (EC 3.2.1.3).

Se utilizó un arreglo de tratamientos factorial con seis repeticiones para probar dos concentraciones de enzimas (4 y 8 U de cada enzima) y tres tiempos de incubación de la reacción a 37 °C (6, 12 y 24 horas), luego se midió la cantidad de glucosa hidrolizada por el método de Somogyi-Nelson (Maldonade *et al.*, 2013) para estimar el contenido de almidón en la muestra.



## Análisis estadístico

La normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos se corroboró con la prueba de Shapiro-Wilks y Levene, respectivamente. Se transformaron las variables clorofila a y clorofila total ( $z^2$ ), peso fresco, seco y longitud de hoja más larga [ $\log(z+1)$ ], peso fresco [ $\log\{z + \sqrt{(z+1)}\}$ ] y seco de bulbo ( $\sqrt{z}$ ), fructosa, azúcares solubles totales en bulbo [ $\log\{z + \sqrt{(z^2+1)}\}$ ] y azúcares reductores en hojas y bulbos ( $1/z$ ). Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza ( $p \leq 0.05$ ) y la prueba de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) con el programa (2023) SAS® OnDemand for Academic.

## Resultados y discusión

### Crecimiento y acumulación de biomasa en bulbos

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

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

Intensidad de luz ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Bulbos			Número de hojas
	Diámetro (cm)	Peso fresco (mg)	Peso seco (mg)	
0	0.27 b	47.21 b	6.21 b	1.20 b
30	0.32 ab	64.50 ab	12.35 b	1.75 ab
60	0.37 ab	71.57 ab	13.78 b	1.8 ab
120	0.31 ab	65.93 ab	16.07 b	1.95 ab
130	0.39 a	119.36 a	33.14 a	2.25 a
DSH (0.05)	0.11	61.95	15.51	0.82

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

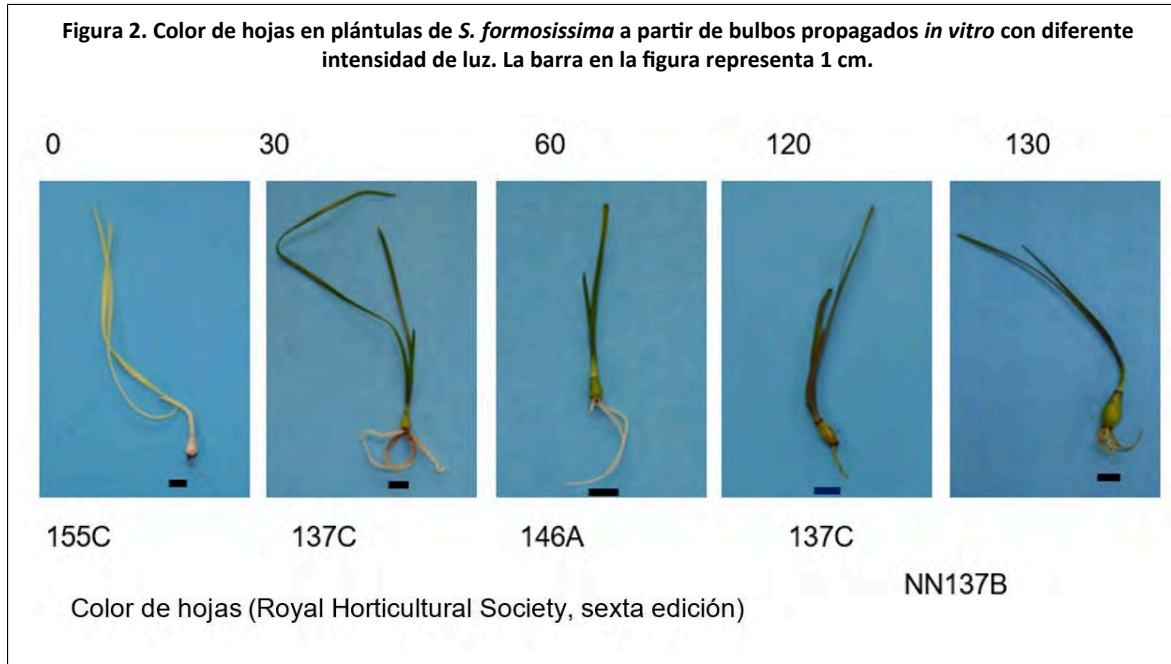
Las plantas cultivadas *in vitro* son generalmente foto-mixotróficas, usan como fuente de carbono la sacarosa del medio de cultivo, aunque pueden satisfacer parte de su demanda mediante fijación fotosintética del  $\text{CO}_2$  disponible en los contenedores donde se cultivan (Badr *et al.*, 2011),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

En *Narcissus papyraceus* cv. Shirazi, los bulbos almacenan nutrientes e incrementan su diámetro ( $11.43 \pm 0.93$  mm) y longitud ( $19.68 \pm 0.52$  mm) bajo condiciones de intensidad de luz alta ( $108 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y  $90 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa (Hosseini *et al.*, 2013). En bulbos de lilis 'Siberia' cultivados *in vitro*, se reportó un incremento del diámetro del bulbo de 443.7% cuando se indujo la diferenciación y llenado de bulbo en la oscuridad y de 245.33% con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad, en comparación con el diámetro inicial de los explantes; el número y longitud de raíces por bulbo fue de 14.53 y 7.31 raíces de 3.68 y 0.79 cm, respectivamente (Zhang y Jia, 2014).

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

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





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

Intensidad de luz ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total
0	0.013 c	0.006 c	0.016 c
30	0.373 b	0.106 bc	0.48 bc
60	0.523 ab	0.133 ab	0.656 ab
120	0.58 ab	0.133 ab	0.72 ab
130	0.713 a	0.21 a	0.923 a
DSH (0.05)	0.306	0.1	0.4

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

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

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

La acumulación de clorofila en hojas de *S. formosissima* registrada en este trabajo con la intensidad de luz de  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , podría ser un mecanismo de protección, tal como lo sugieren Alvarenga *et al.* (2015), quienes cultivaron *Achillea millefolium* (asterácea que forma rizoma) *in vitro*, con cinco intensidades de luz, 13, 27, 35, 47 y  $69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y en la que registraron la mayor concentración

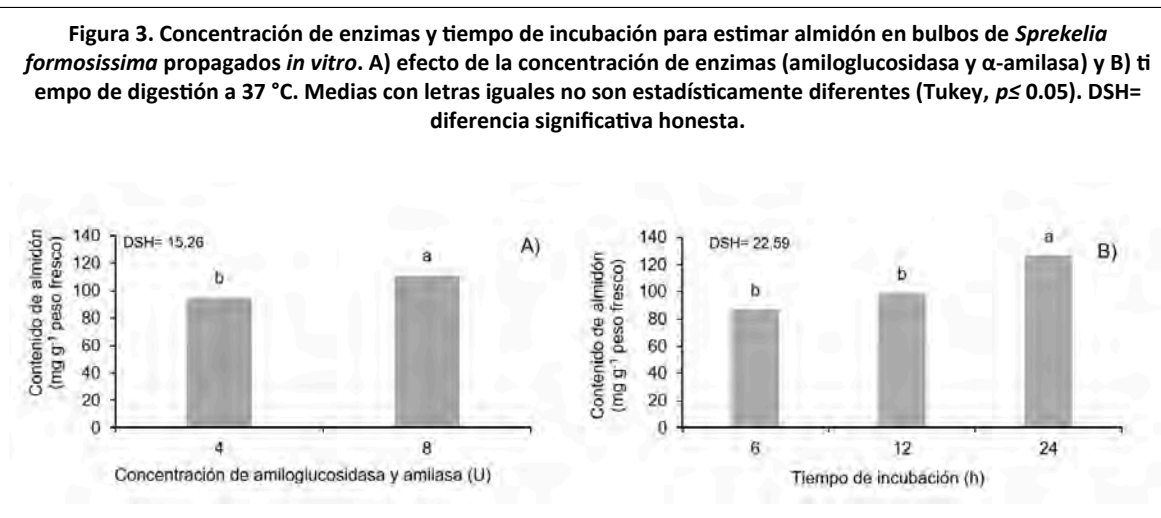
de clorofila a, b y total (1.18, 0.63 y 1.81 mg g<sup>-1</sup> peso fresco) con la intensidad de luz más alta, pero con el crecimiento vegetativo mayor (número de raíces, longitud de brote y acumulación de materia seca) con 27 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

En contraste, la mayor acumulación de biomasa en bulbos de *S. formosissima* con 130 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de luz probada en este experimento puede explicarse por el incremento en el número de hojas, clorofila y fotosíntesis que permitió movilizar y acumular en estos órganos una mayor cantidad de fotosintatos generados en las hojas en comparación de los bulbos en la oscuridad que obtuvieron el carbono únicamente de la sacarosa del medio o los bulbos con intensidades de luz más baja que obtuvieron una menor cantidad de carbono mediante la fijación de CO<sub>2</sub>.

Estos resultados demuestran que la respuesta a la intensidad alta de luz es diferente entre las especies y que solo las plantas adaptadas a radiación alta en su medio natural presentan mayor tasa fotosintética y crecimiento, bajo estas condiciones *in vitro* (Cavallaro *et al.*, 2022).

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

La interacción entre la concentración enzimática y el tiempo de digestión de almidón no fue significativa ( $p \leq 0.05$ ), aunque de forma independiente, el mayor grado de hidrólisis de almidón en los bulbillos de *S. formosissima* se registró con 8 U de ambas enzimas, α-amilasa y amiloglucosidasa, con 110.71 mg g<sup>-1</sup> peso fresco y 24 h de digestión, con 125.87 mg g<sup>-1</sup> peso fresco (Figura 3). Esta cantidad es 16 y 1.3 veces superior a la cantidad de α-amilasa y amiloglucosidasa que Smith y Zeeman (2006) sugieren para determinar el contenido de almidón en tejido vegetal con cuatro horas de incubación a 37 °C.



La mezcla de ambas enzimas fue eficiente para la digestión del almidón en bulbos de *S. formosissima* aunque, algunas investigaciones sugieren usar solo una enzima lo que parece no ser adecuado con base en los resultados de la digestión de almidón de maíz y papa donde se probaron diferentes tiempos de digestión con amiloglucosidasa sola (14 U) y con las enzimas α-amilasa y amiloglucosidasa juntas (25 y 14 U, respectivamente), la hidrólisis del almidón fue más rápida con ambas enzimas y a las 24 h casi todo el almidón del maíz fue hidrolizado a glucosa mientras que un tercio del almidón de papa permaneció sin hidrolizar (Zhang *et al.*, 2013).

En *Lilium lancifolium* se determinó el contenido de almidón en bulbos maduros y bulbillos recién formados con 50 U de α-amilasa con un tiempo de digestión de 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 h. El almidón de los bulbillos mostró menor resistencia a la digestión con el porcentaje mayor de almidón (40%) registrado a las 24 h comparado con bulbos en los que se registró cinco veces menos almidón en este mismo tiempo.

Estas variaciones de concentración enzimática y tiempo de digestión en la determinación del contenido de almidón en tejido vegetal se deben a las diferencias en las características de este polisacárido, entre ellas el tamaño del gránulo, la proporción de amilosa y amilopectina y edad del tejido (Yu *et al.*, 2015).

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

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

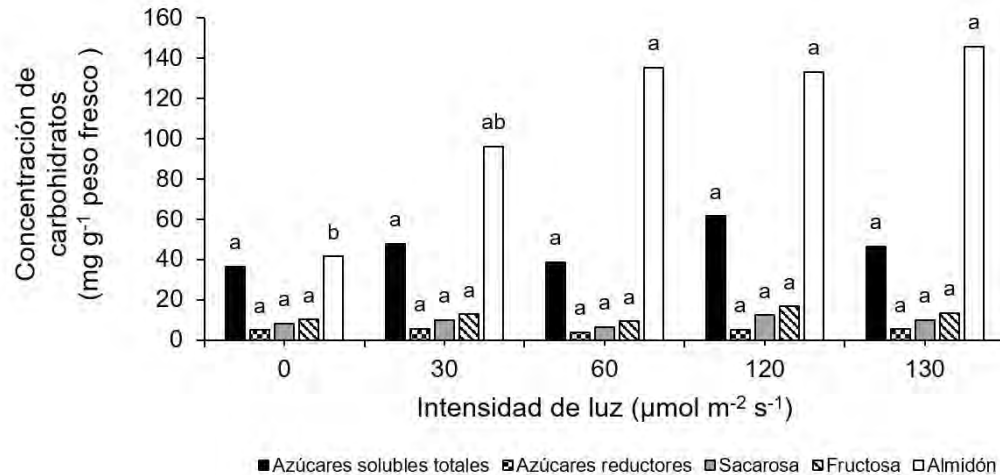
### Carbohidratos no estructurales en hojas y bulbos

El contenido de almidón se incrementó 225, 221 y 251% en los bulbos que crecieron en 60, 120 y 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz, respectivamente, en comparación con los bulbos cultivados en la oscuridad (Figura 4). La síntesis de carbohidratos de reserva, incluido el almidón, está altamente relacionada con la última etapa en la formación de órganos de almacenamiento en las plantas geófitas, que se caracteriza por el crecimiento de estos órganos (Podwyszynska, 2012) y el almacenamiento de almidón en grandes cantidades, lo que asegura una fuente de carbono y suministro de energía durante condiciones no favorables y una brotación y crecimiento reproductivo rápidos en condiciones ambientales favorables (Ranwala y Miller, 2008).





**Figura 4. Efecto de la intensidad de luz sobre el contenido de carbohidratos no estructurales en bulbos de *S. formosissima* propagados *in vitro*. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) con diferencia significativa honesta (DSH) para azúcares solubles totales= 33.06; azúcares reductores= 3.3; sacarosa= 6.38; fructosa= 9.38 y almidón= 68.96.**



En este experimento, el incremento en la acumulación de almidón en bulbos de *S. formosissima in vitro* por efecto de una mayor intensidad de luz, coincide con lo reportado en bulbos de *Lachenalia 'Rupert'* en los que la luz blanca ( $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y azul promovieron la acumulación de almidón, mientras que la oscuridad y la luz roja disminuyeron la concentración de este carbohidrato con concentraciones de 4.7 a  $105 \text{ mg g}^{-1}$  de peso seco (Bach *et al.*, 2015).

Estos resultados sugieren que conocer la intensidad de luz máxima adecuada en la micropropagación puede utilizarse como estrategia para incrementar el contenido de almidón y el tamaño los bulbillos de *S. formosissima* obtenidos por esta técnica.

## Conclusiones

A diferencia del crecimiento *in vitro* de otras especies de geófitas bien caracterizadas, nuestros resultados indican que emular las condiciones de oscuridad en las que se desarrollan normalmente los bulbos no determina la movilización de carbohidratos a estos órganos en *S. formosissima*, lo que impacta en la disminución de biomasa. En cambio, se observó que el desarrollo de tejidos fotosintéticos en presencia de luz fue más favorable para la obtención de bulbos con mayor biomasa y mayor contenido de reservas.

Si bien, se observó que los azúcares solubles en el bulbo no fluctuaron en concentración en los diferentes niveles de exposición a luz, la acumulación de almidón se incrementó significativamente en bulbos a medida que aumentó la intensidad de la luz. Esto sugiere que la acumulación de biomasa y almidón en bulbos de *S. formosissima* cultivados *in vitro* están fuertemente regulados por el desarrollo de órganos fotosintéticos y su transición demanda-fuente.

Otros determinantes además de la luz, como la condición nutricional o el desarrollo de raíces, necesitan ser estudiados. Sin embargo, observar que altas intensidades de luz *in vitro* promueven el crecimiento y almacenamiento de almidón en órganos de reserva, puede ser utilizado como una estrategia para inducir la bulbificación en *S. formosissima*.



## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) y la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

## Bibliografía

- 1 Alvarenga, I. C. A.; Pacheco, F. V.; Silva, S. T.; Bertolucci, S. K. V. and Pinto, J. E. B. P. 2015. *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. *Plant cell, tissue and organ culture*. 2(122):299-308. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0766-7>.
- 2 Bach, A.; Kapczyńska, A.; Dziurka, K. and Dziurka, M. 2015. Phenolic compounds and carbohydrates in relation to bulb formation in *Lachenalia* 'Ronina' and 'Rupert' *in vitro* cultures under different lighting environments. *Scientia Horticulturae*. 1(188):23-29. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.02.038>.
- 3 Badr, A.; Angers, P. and Desjardins, Y. 2011. Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 1(107):13-24. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9951-5>.
- 4 Batista, D. S.; Felipe, S. H. S.; Silva, T. D.; de Castro, K. M.; Mamedes-Rodrigues, T. C.; Miranda, N. A.; Ríos-Ríos, A.M.; Faria, D. V.; Fortini, E. A.; Chagas, K.; Torres-Silva, G.; Xavier, A.; Arencibia, J. D. and Otoni, W. C. 2018. Light quality in plant tissue culture: does it matter? *In vitro cellular and developmental biology plant*. 3(54):195-215. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9902-5>.
- 5 Borys, M. W.; Leszczynska-Borys, H. and Galván J. L. 2005. Variants in *Sprekelia formosissima* (L.) Herbert. *In: 51<sup>st</sup> annual meeting interamerican society for tropical horticulture*. Boca Chica, República Dominicana. 31-37 pp.
- 6 Cavallaro, V.; Pellegrino, A.; Muleo, R. and Forgiione, I. 2022. Light and plant growth regulators on *in vitro* proliferation. *Plants*. 7(11):1-45. <https://doi.org/10.3390/plants11070844>.
- 7 Cázarez, P. M.; Andrade, R. M.; Villegas, M. A.; Alia, T. I.; Villegas, T. O. G. and López, M. V. 2010. *In vitro* propagation of *Sprekelia formosissima* Herbert, a wild plant with ornamental potential. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 3(33):197-203.
- 8 Cheesman, L.; Finnie, J. J. and Van Staden, J. 2010. *Eucomis zambesiaca* Baker: factors affecting *in vitro* bulblet induction. *South African Journal of Botany*. 3(76):543-549. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.04.004>.
- 9 Cruz-Duque, A. A.; Tapia-Campos, E.; Rodríguez-Domínguez, J. M. and Barba-González, R. 2019. Research on native ornamental species from Mexico. *Acta Horticulturae*. 1240(1):1-12. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1240.1>.
- 10 De Klerk, G. J. 2012. Micropropagation of bulbous crops: technology and present state. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*. 1(6):1-8.
- 11 Hosseini, R.; Moradnejad, M.; Nezami-Alanagh, E.; Ashrafi, S. and Ghane-Golmohammadi, F. 2013. Somatic embryogenesis and bulblet production in *Narcissus papyraceus* cv. Shirazi: effect of plant growth regulators, light intensity, sucrose concentration, methyl jasmonate and anti-gibberellins. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 2(1):27-34.
- 12 Kamenetsky, R. 2017. Development and utilization of ornamental geophytes: research challenges and sustainable production. *Acta Horticulturae*. 1171(1):9-16. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1171.2>.
- 13 Kim, Y.; Hasegawa, P. and Bressan, R. 1981. *In vitro* propagation of hyacinth [*Hyacinthus orientalis*]. *HortScience*. 5(16):645-647. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.16.5.645>.

- 14 Kumar, S.; Kanwar, J. K. and Sharma, D. R. 2006. *In vitro* propagation of *Lilium*. *Advances in Horticultural Science*. 2(20):181-188.
- 15 Maldonado, I. R.; Cavalho, P. G. B; Ferreira, N. A. e Moulin, B. S. F. 2013. Protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Comunicado Técnico 86 ISSN 1414.9850. Brasília, Brasil. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/956360/1/cot86.pdf>.
- 16 Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 3(15):473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- 17 Podwyszynska, M. 2012. The mechanisms of *in vitro* storage organ formation in ornamental geophytes. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*. 1(6):9-23.
- 18 Porra, R. J.; Thompson, W. A. and Kreidemann, P. E. 1989. Determination of accurate extinctions coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standars by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics*. 3(975):384-394. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(89\)80347-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80347-0).
- 19 Quesada, M. S. 2007. Manual de experimentos de laboratorio para bioquímica. EUNED. San José Costa Rica. 148 p.
- 20 Rahimi, K. M.; Rezadoost, H.; Heydari, R. and Mirjalili, M. H. 2020. Effect of photoperiod and plant growth regulators on *in vitro* mass bulblet proliferation of *Narcissus tazetta* L. (Amaryllidaceae), a potential source of galantamine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1(142):187-199. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01853-y>.
- 21 Ranwala, A. P. and Miller, W. B. 2008. Analysis of nonstructural carbohydrates in storage organs of 30 ornamental geophytes by high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *New Phytologist*. 2(180):421-433. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02585.x>.
- 22 Rice, L. J.; Finnie, J. F. and Van Staden, J. 2011. *In vitro* bulblet production of *Brunsvigia undulata* from twin-scales. *South African Journal of Botany*. 2(77):305-312. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.08.011>.
- 23 Rover, M. R.; Johnston, P. A.; Lamsal, B. P. and Brown, R. C. 2013. Total water-soluble sugars quantification in bio-oil using the phenol sulfuric acid assay. *Journal of analytical and applied pyrolysis*. 1(104):194-201. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2013.08.004>.
- 24 SAS Institute Inc. 2023. SAS OnDemand for Academics. <https://www.sas.com/en-us/software/on-demand-for-academics.html>.
- 25 Sevgin, N. and Karatas, M. 2022. Micropropagation of geophytes (bulbous tuberous rhizome plants) *In Mathematics and Natural Science Karapinar*, R. Ed. Livre de Lyon. Lyon, Francia. 99-121 pp.
- 26 Smith, A. M. and Zeeman, S. C. 2006. Quantification of starch in plant tissues. *Nature Protocols*. 3(1):1342-1345. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.232>.
- 27 Takahashi, S. and Murata, N. 2008. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science*. 4(13):178-182. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.01.005>.
- 28 Ulrich, M. R.; Davies, F. T.; Koh, Y. C.; Duray, S. A. and Egilla, J. N. 1999. Micropropagation of *Crinum 'Ellen Bosanquet'* by tri-scales. *Science Horticulture*. 1-2(82):95-102. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(99\)00037-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00037-0).
- 29 Yang, L.; Wen, K. S.; Ruan, X.; Zhao, Y.; Wei, F. and Wang, Q. 2018. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*. 4(23):1-26. <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>.

- 30 Yu, X.; Zhang, J.; Shao, S.; Yu, H.; Xiong, F. and Wang, Z. 2015. Morphological and physicochemical properties of bulb and bulbil starches from *Lilium lancifolium*. *Starch# Stärke*. 5(67):448-458. <https://doi.org/10.1002/star.201400209>.
- 31 Zhang, B.; Dhital, S. and Michael, M. J. 2013. Synergistic and antagonistic effects of  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase on starch digestion. *Biomacromolecules*. 6(14):1945-1954, <https://doi.org/10.1021/bm400332a>.
- 32 Zhang, M. and Jia, G. 2014. The effects of sucrose concentration and light condition on lily's bulblet-in-tube production and inclusion content. *Pakistan Journal of Botany*. 1(46):307-315.
- 33 Zhao, Y.; Liu, C.; Sui, J.; Liang, J.; Ge, J.; Li, J.; Pan, W.; Yi, M.; Du, Y. and Wu, J. 2022. A wake-up call: signaling in regulating ornamental geophytes dormancy. *Ornamental Plant Research*. 8(2):1-10. <https://doi.org/10.48130/OPR-2022-0008>.



## La luz promueve la bulbificación *in vitro* de *Sprekelia formosissima*

Journal Information
Journal ID (publisher-id): remexca
Title: Revista mexicana de ciencias agrícolas
Abbreviated Title: Rev. Mex. Cienc. Agríc
ISSN (print): 2007-0934
Publisher: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Article/Issue Information
Date received: 01 March 2024
Date accepted: 01 June 2024
Publication date: 06 December 2024
Publication date: Oct-Nov 2024
Volume: 15
Issue: 7
Electronic Location Identifier: e3511
DOI: 10.29312/remexca.v15i7.3511

### Categories

Subject: Artículo

### Palabras clave:

**Palabras clave:**

carbohidratos

intensidad de luz

micropropagación de geófitas

### Counts

Figures: 4

Tables: 2

Equations: 0

References: 33

Pages: 0