



REGENERACIÓN *in vitro* DE PLANTAS DE *Polianthes tuberosa* L. A PARTIR DE TEJIDO FOLIAR Y DE BOTÓN FLORAL †

[*In vitro* PLANT REGENERATION OF *Polianthes tuberosa* L. FROM LEAF AND FLOWER BUDS TISSUE]

Fanny Hernández-Mendoza^{1*}, Guillermo Carrillo-Castañeda¹, Víctor García-Gaytán², Martha E. Pedraza-Santos³, Eulogio de la Cruz-Torres⁴ and Ma. del Carmen Mendoza-Castillo¹

¹Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Carretera Federal México-Texcoco, km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado México. C. P. 56230, México. Email.

*hernandez.fanny@colpos.mx

²El Colegio de Michoacán, (LADiPA), A. C., Cerro de Nahuatzen 85, La Piedad 59699, Michoacán, México.

³Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" UMSNH. Paseo Lázaro Cárdenas esquina con Berlín, Colonia Viveros, Uruapan, Michoacán, C. P. 60170, México.

⁴Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Carretera México-Toluca s/n. La Marquesa, Ocoyoacac, C. P. 52750, México.

*Corresponding author

SUMMARY

Background. Tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) is a native plant of central and southern Mexico, cultivated for cut flower and as for the perfume industry. Farmers propagate it vegetatively, so it is important to generate new varieties by implementing efficient techniques, both to induce mutations and micro-propagation. **Objective.** Establish the protocol for the *in vitro* propagation of *P. tuberosa* L. from foliar and flower tissue. **Methodology.** Leaf and button explants were placed on the surface of the culture medium base GC, containing inorganic salts Murashige and Skoog (1962) per liter, coconut water 50 mL L⁻¹, 20 g L⁻¹ of sucrose, 6.4 g L⁻¹ of agar, being the pH adjusted to 5.7. With this basic medium were prepared a series of culture media containing benzylaminopurine (BAP), naphthaleneacetic acid (ANA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), indole acetic acid (IAA) and kinetin. **Results.** Shoot regeneration (3.5 %) was solely from button tissue explants on solid media containing BAP and ANA; media T1 (1.1 %), T3 (3.5 %) and T11 (2.5 %). The shoots developed roots in the medium with indolbutiric acid (1 mg L⁻¹) and BAP (0.1 mg L⁻¹). In foliar tissue cultures, the regeneration of green callus was achieved in a higher percentage (50.9 %) in the solid media with BAP (4.5 mg L⁻¹) and ANA (0.05 mg L⁻¹) and sucrose 20 g L⁻¹. **Implications.** The protocol was developed that allowed obtaining tuberose seedlings from flower buds. This attributes to the *in vitro* conservation of germplasm, and initiating genetic improvement programs for *P. tuberosa* with new and desirable characteristics, to increase biodiversity in the crop. **Conclusions.** Both shoot induction and development were observed in media containing BAP (4.5 mg L⁻¹) and ANA (0.1 mg L⁻¹).

Keywords: Plantlet regeneration; culture media; growth regulators.

RESUMEN

Antecedentes. *Polianthes tuberosa* L. (nardo) es una planta nativa del centro y sur de México, cultivada para flor de corte y para la industria del perfume. Los agricultores la propagan vegetativamente, por lo que es importante generar nuevas variedades implementando técnicas eficientes, tanto para inducir mutaciones como de micro-propagación. **Objetivo.** Establecer el protocolo para la propagación *in vitro* *P. tuberosa* L. a partir de tejido foliar y de flor. **Metodología.** Explantes de hoja madura y botón fueron colocados sobre la superficie del medio de cultivo, base GC con las sales inorgánicas del medio Murashige y Skoog (1962) por litro, agua de coco 50 mL, sacarosa 20 g, agar 6.4 g y el pH fue ajustado a 5.7. Con este medio básico se prepararon medios de cultivo que contenían bencilaminopurina (BAP), ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indolacético (AIA) y cinetina. **Resultados.** La regeneración de brotes (3.5 %) fue únicamente a partir de explantes de tejido de botón en medios sólidos que contenían BAP y ANA: medios T1 (1.1 %), T3 (3.5 %) y T11 (2.5 %). Los brotes desarrollaron raíces en el medio con 1.0 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico y 0.1 mg L⁻¹ de BAP. En los cultivos de tejido foliar se logró la regeneración de callo verde en mayor porcentaje (50.9 %) en el medio sólido con 4.5 mg de BAP L⁻¹, 0.05 mg L⁻¹ de ANA y 20 g L⁻¹ de sacarosa. **Implicaciones.** Se desarrolló el protocolo que permitió obtener plántulas de nardo a partir

† Submitted December 17, 2020 – Accepted February 16, 2021. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License. ISSN: 1870-0462.

de botón floral. Esto atribuye a la conservación *in vitro* del germoplasma, e iniciar programas de mejoramiento genético de *P. tuberosa* con características nuevas y deseables, para incrementar la biodiversidad en el cultivo. **Conclusiones.** Tanto la inducción y desarrollo de brotes fue observada en los medios que contenían BAP (4.5 mg L^{-1}) y ANA (0.1 mg L^{-1}).

Palabras Clave: Regeneración de plántulas; medios de cultivo; reguladores de crecimiento.

INTRODUCCIÓN

Polianthes tuberosa L. (nardo), planta nativa del centro y sur de México al que los aztecas llamaron Omixochitl (flor de hueso), es cultivada fundamentalmente para flor de corte (Benschop, 1993), por su tamaño, fragancia y larga vida en florero. Asimismo, por su olor, los extractos de flores de nardo tienen un alto valor debido a las reacciones metabólicas secundarias para la síntesis de varios compuestos comerciales importantes en la industria del perfume y cosmética (Sangavai y Chellapandi 2008; Rammamurthy *et al.* 2010).

Este cultivo presenta relativamente poca variabilidad genética (Sirohi *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2019), debido, en parte, a que de manera rutinaria los agricultores propagan las plantas vegetativamente a partir de las yemas de los cormos situadas en la base de las estructuras caulinares y, por esta razón, son multiplicadas prácticamente de manera clonal; en términos relativos, provienen de pocos genotipos (Shillo, 1992). El cultivo, en relación al color de la flor, es blanco como todos los cultivares conocidos de *P. tuberosa* y, en relación a los tipos, únicamente se conocen dos, la simple y la doble, que son cultivados en todo el mundo (Singh *et al.*, 2019). Ranchana *et al.* (2013) determinó la variabilidad genética, evaluaron en cinco genotipos de nardo (doble) doce caracteres diferentes de la planta.

La diversidad genética es vital para el perfeccionamiento de las especies, pues, dentro de esa diversidad se pueden encontrar rasgos que resultarán útiles para las variedades modernas de este cultivo, tanto de adaptación a las condiciones ambientales como a los grandes cambios climáticos que están ocurriendo (Estrada-Basaldua *et al.*, 2011), como los de importancia estética en floricultura y química para la elaboración de perfumes. Por lo tanto, a mayor grado de biodiversidad, mayor facilidad de encontrar esos rasgos genéticos en el cultivo por lo que esta especie representa un verdadero reto para quienes deseen modificar sus características para generar nuevas variedades.

Puede llevar mucho tiempo, posiblemente hasta décadas, incorporar el rasgo genético que quisiera ser incorporado a este cultivo, mediante la aplicación de métodos agrícolas tradicionales, por eso se deben utilizar métodos innovadores más eficientes, para ayudar a acortar este proceso y hacerlo más factible.

Un procedimiento para incrementar la variabilidad en esta especie consiste en implementar técnicas eficientes y prácticas para inducir mutaciones (Estrada-Basaldua *et al.*, 2011) acoplada a técnicas eficientes para propagar *in vitro* las plántulas valiosas de forma masiva. Esta estrategia se plantea como auxiliar a los métodos tradicionales del mejoramiento para obtener los resultados deseados (Rodríguez, 1988).

Los métodos de micropropagación, permiten la regeneración masiva de plantas a partir de tejidos y órganos, con esta técnica, se pueden generar plantas clonadas, plantas libres de virus y rescatar mutantes generadas en células somáticas (Castilla *et al.*, 2014). Mediante esta tecnología, es factible generar de manera masiva individuos de fenotipos seleccionados por sus características de valor ornamental, tanto morfológicas como de color de hojas y flores, así como aquellos de nuevas fragancias.

Los segmentos de cormo son los explantes que comúnmente han sido utilizados por muchos biotecnólogos para regenerar *in vitro* brotes de nardo (Muralidhar y Mehta, 1982; Bose *et al.*, 1987; Khan *et al.*, 2000; Rajasekharan *et al.*, 2000; Nazneen *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2006; Sangavai y Chellapandi, 2008; Gajbhiye *et al.*, 2011; Naz *et al.*, 2012); sin embargo, con esta parte de la planta, el principal obstáculo para el establecimiento de los cultivos *in vitro* es la contaminación. La regeneración de plantas a partir de segmentos de ápices (Hutchinson *et al.*, 2004), discos de hoja (Bindhani *et al.*, 2004), de raíz (Narayanswamy y Prabhudesai, 1979) y anteras (Gi y Tsay, 1989) también se ha intentado por varios biotecnólogos pero, los resultados que han obtenido están en la etapa preliminar. Beyrami *et al.* (2008) regeneraron plantas a partir de tejido de cormo, callos de anteras y hojas. Con variedades de *P. tuberosa* de la India y utilizando el medio MS que contiene 6.0 mg L^{-1} de BAP, 0.5 mg L^{-1} de ANA, 0.7 mg L^{-1} de 2,4-D y 0.5 mg L^{-1} de TDZ, Kadam *et al.* (2010) lograron la obtención de brotes a partir de tejido de tépalos (4.0%) y de botones florales (4.33%). En Taiwán, Shen *et al.* (1991) intentaron la micropropagación de *P. tuberosa* utilizando el medio MS modificado que contiene 2.25 mg L^{-1} de BAP y 0.5 mg de ANA logrando la obtención de brotes a partir de tejidos de botón. Otsuji *et al.* (1994) interesados en la obtención de polisacáridos de nardo, obtuvieron la regeneración de callo a partir de segmentos de tejido de tépalos, en cultivos en suspensión. Hernández-Mendoza *et al.* (2014)

regeneraron brotes *in vitro* a partir de yemas vegetativas de la inflorescencia y de tejido de cormo. De acuerdo a la revisión de literatura, únicamente dos grupos de investigadores, el de Kadam *et al.* (2010) y el de Shen *et al.* (1991) han logrado la regeneración de brotes de nardo a partir de tejidos de la flor. El presente estudio se realizó con el objetivo de contribuir al establecimiento de la tecnología para propagar *in vitro* plántulas de *P. tuberosa* de manera altamente eficiente a partir tanto de tejido de hojas como de tejido de botón floral plenamente desarrollados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Botones de inflorescencias de *P. tuberosa* obtenidas en la Central de Abastos de la Ciudad de México, Delegación Iztapalapa y en el mercado local de Texcoco, Edo. de México. Así como hojas maduras de plantas cultivadas en un invernadero ubicado en el predio del Colegio de Postgraduados (Carretera Los Reyes-Textcoco, km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado México) que originalmente fueron obtenidas en el vivero de San Andrés, Municipio de Zumpahuacán, Estado de México.

Medios de cultivo

El medio de cultivo base utilizado fue el GC (Guillermo Carrillo, comunicación personal) que contiene las sales inorgánicas del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962), agua de coco 50 mL L⁻¹, sacarosa 20 g L⁻¹ y agar 6.4 g L⁻¹. Con este medio básico se preparó una serie de medios de cultivo que contenían los reguladores de crecimiento vegetal BAP, 2,4-D, ANA, AIA, Cinetina y TDZ y según se describe en la Tabla 1.

El pH de los medios fue ajustado a 5.7 con un potenciómetro Sargent-Welch modelo LS y posteriormente el agar fue agregado. La esterilización se llevó a cabo en una autoclave (1.05 kg/cm² de presión) durante 15 minutos. En frascos de vidrio de 100 mL de capacidad con tapa de rosca previamente esterilizados fueron servidos 20 mL de medio, en una campana de flujo laminar.

Establecimiento de los cultivos *in vitro*

Desinfección

Se utilizaron botones florales de aproximadamente 2 cm de longitud (Figura 1) y hojas sanas, sin daño mecánico de nardo. Los botones y hojas se lavaron con agua y detergente, se sumergieron en alcohol de 70 % v/v, después en solución de detergente antibacterial (1.3 % v/v) durante dos minutos en cada solución y, finalmente en una solución de hipoclorito de sodio comercial 40 % v/v durante 15 minutos. Las soluciones fueron preparadas con agua destilada. Posteriormente, en la campana de flujo laminar la solución de hipoclorito de sodio fue retirada para enjuagar los botones florales y los segmentos de hoja cuatro veces con agua destilada estéril.

Establecimiento de los cultivos *in vitro*. De cada botón (pedicelo), segmentos de tejido de aproximadamente 3 mm de grueso fueron obtenidos al practicar dos cortes transversales en la parte basal del botón. Cinco segmentos por frasco fueron colocados sobre el medio de cultivo sólido y seis frascos fueron preparados por cada condición experimental (Tabla 1). Cuatro segmentos de hoja de aproximadamente 1 cm² fueron colocados sobre la superficie del medio en cada frasco, preparándose seis frascos por condición experimental.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo GC utilizados para la inducción de brotes de *Polianthes tuberosa* a partir de tejido foliar y de botones florales.

Medio de cultivo	BAP (mg L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)	TDZ (mg L ⁻¹)	AIA (mg L ⁻¹)	Cinetina (mg L ⁻¹)
T1	2.00		0.50			
T2	1.00		0.25			
T3	4.50		0.10			
T4	2.25		0.05			
T5	2.00	0.70	0.50	0.5		
T6	1.25	0.12				
T7	1.00		0.20			
T8					4.0	2.6
T9	2.00		0.25			
T10	1.00		0.50			
T11	4.50		0.05			
T12	2.25		0.10			



Figura 1. Aspecto de los botones florales de nardo utilizados.

Los explantes se incubaron a 26 - 29 °C y con fotoperiodo de 16 horas de luz blanca fría fluorescente (lámparas de 75 W y radiación fotosintéticamente activa de 45 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Al final de cada mes de incubación, los cultivos fueron evaluados y transferidos a un medio de cultivo fresco para así cultivarlos durante un periodo de cuatro meses.

Diseño experimental

Los explantes se distribuyeron bajo un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones por condición experimental. A los 30 y

hasta los 120 días después de la siembra se registró el porcentaje de las variables: contaminación, desarrollo de callo, desarrollo de tépalos, número de brotes, desarrollo de proembriones, raíz, cultivos sin diferenciación, promedio de brotes por explante y total de brotes.

Análisis estadístico

Un análisis de varianza para cada una de las variables registradas fue realizado con el paquete estadístico SAS (SAS, 2002) versión 9.0. Se utilizó el procedimiento ANOVA para el análisis de varianza y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para la comparación de medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta investigación se llevó a cabo con la finalidad de establecer procedimientos que permitieran generar, de manera práctica y eficiente, plántulas de nardo a partir de botón floral y tejido foliar.

Desarrollo de brotes en los cultivos de *Polianthes tuberosa*

En la presente investigación, los brotes se regeneraron en la superficie del explante directamente sin formación de callos (organogénesis directa).

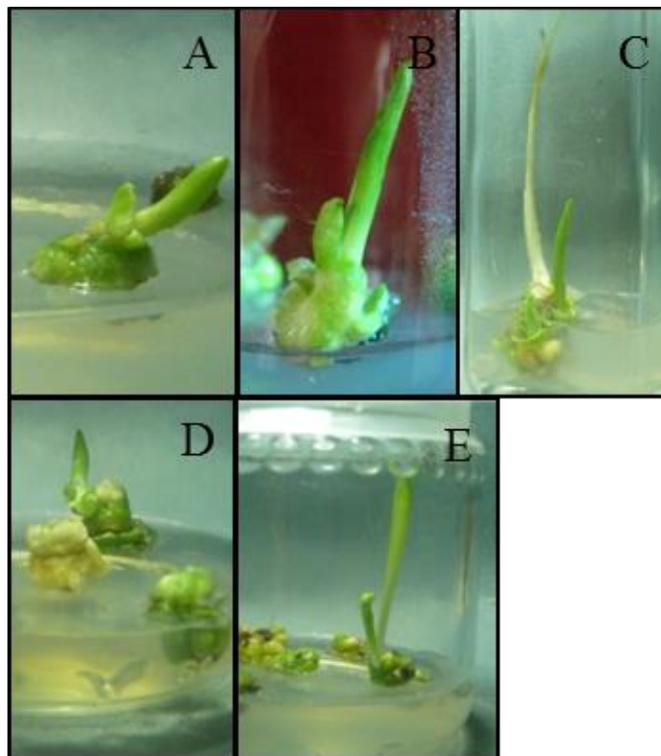


Figura 2. Aspecto de los brotes generados a partir de cultivos de botón de *P. tuberosa*. A, B y C son cultivos desarrollados en el medio T3 durante uno, dos y cuatro meses de incubación, respectivamente. D y E son cultivos desarrollados en el medio T11, al mes y tres meses de cultivo, respectivamente.

La regeneración de brotes a partir de tejido de botón se logró en 120 días, únicamente en los medios T1 (1.1 %), T3 (3.5 %), y T11 (2.5 %) (Figura 2), según se muestra en las Tablas 2 y 3. Dos brotes se regeneraron en un explante cultivado en el medio T11, a los dos meses de establecidos los cultivos, se pudo observar, en el tejido del pedicelo, el desarrollo de los brotes que dieron origen a las pequeñas plántulas. En los 120 días de cultivo en 11 de los 12 medios, los explantes desarrollaron proembriones.

En Taiwán Shen *et al.* (1991) regeneraron brotes a partir de botón en el medio MS modificado que contenía BAP, 2.25 mg y ANA, 0.5 mg

En la investigación presente se proporciona información acerca de la regeneración de brotes a partir de explantes de botón floral y, la mayor

formación de brotes se presentó en el medio de cultivo que contenía BAP (4.5 mg L⁻¹) y ANA (0.1 mg L⁻¹). En Taiwán, Shen *et al.* (1991) en una comunicación preliminar, logran la regeneración de plantas a partir de botón en el medio MS modificado que contenía 2.25 mg de BAP y 0.5 mg de ANA, aplicando la citocinina en menor cantidad y auxina en concentración mayor. En la India Kadam *et al.* (2010) lograron la regeneración de brotes a partir de tépalos (4.0 %) así como de botón floral (4.33 %) en el medio MS y cuatro reguladores de crecimiento (6 mg L⁻¹ de BAP, 0.5 mg L⁻¹ de ANA, 0.7 mg L⁻¹ de 2,4-D, y 0.5 mg L⁻¹ de TDZ) y, como se observa, utilizaron mayores concentraciones de esos reguladores que las concentraciones utilizadas en el trabajo presente. Posteriormente Gajbhiye *et al.* (2011), obtuvieron la regeneración directa a partir de discos de tejido de tallo.

Tabla 2. Respuesta de los explantes de tejido de botón de *Polianthes tuberosa* desarrollados en la serie de medios de cultivo que se indican.

Medio de cultivo	Cultivos con crecimiento o generación de:				
	Tépalos	Callo	Raíz	Brotos	Proembriones
T1	+	+	+	+	+
T2	+	+	-	-	+
T3	+	+	-	+	+
T4	+	+	-	-	+
T5	-	+	-	-	-
T6	-	+	+	-	+
T7	+	+	+	-	+
T8	+	+	+	-	+
T9	+	+	+	-	+
T10	+	+	+	-	+
T11	+	+	+	+	+
T12	+	+	-	-	+

- Sin respuesta, + Con desdiferenciación

Tabla 3. Tipo de desarrollo observado en los explantes de tejido de botón de *Polianthes tuberosa* al ser cultivados en los medios de cultivo indicados. Los datos de tépalos, raíz y brotes se expresan en porcentajes y desviación estándar (\pm).

Medio de cultivo	Cultivos con crecimiento o generación de:				
	Tépalos	Raíz	Brotos	Número de brotes por cultivo	Total de brotes
T1	36.2 \pm 0.5 b	6.6 \pm 0.6 ab	1.1 \pm 0.5 ab	1.0	1.0
T2	17.7 \pm 0.0 cd	0.0 \pm 0.0 d	0.0 \pm 0.0 b	0.0	0.0
T3	40.0 \pm 0.6 a	0.0 \pm 0.0 d	3.5 \pm 0.0 a	1.0	4.0
T4	17.4 \pm 0.8 c	0.0 \pm 0.0 d	0.0 \pm 0.0 b	0.0	0.0
T5	0.0 \pm 0.5 e	0.0 \pm 0.0 d	0.0 \pm 0.0 b	0.0	0.0
T6	0.0 \pm 0.0 e	4.2 \pm 0.0 bcd	0.0 \pm 0.0 b	0.0	0.0
T7	13.9 \pm 0.8 cd	4.3 \pm 0.5 abc	0.0 \pm 0.0 b	0.0	0.0
T8	11.7 \pm 0.6 d	7.5 \pm 0.5 a	0.0 \pm 0.0 b	0.0	0.0
T9	18.3 \pm 0.0 c	2.6 \pm 0.5 cd	0.0 \pm 0.0 b	0.0	0.0
T10	15.8 \pm 0.5 cd	6.6 \pm 0.8 ab	0.0 \pm 0.0 b	0.0	0.0
T11	25.0 \pm 0.6 b	1.7 \pm 0.6 cd	2.5 \pm 1.0 ab	1.5	3.0
T12	24.2 \pm 0.5 b	0.0 \pm 0.0 d	0.0 \pm 0.0 b	0.0	0.0

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas $p \leq 0.05$

Estos investigadores para regenerar los brotes utilizaron medios de cultivo de constitución sólida y cierto número de reguladores de crecimiento. En el trabajo presente, los medios contenían únicamente dos reguladores del crecimiento, BAP y ANA y así, se regeneraron 8 brotes en tres medios de cultivo (Tabla 2), en mayor porcentaje en el medio (22) que contenía 4.5 mg L⁻¹ de BAP y 0.1 mg L⁻¹ de ANA. El costo de los reactivos es importante en todo proceso y, por tanto, este factor debe tomarse en cuenta. En estudios que se han realizado consideran que el regulador de crecimiento BAP es importante en la propagación *in vitro* de *P. tuberosa* (Naz *et al.*, 2012). Sangavai y Chellapandi, 2008 obtuvieron una mayor frecuencia de regeneración de explantes y diferenciación de brotes (2.2±1.2 brotes/explante) con 1.5 mg L⁻¹ en medio MS, utilizando meristemas de cormo. Resultados contrastantes obtuvieron Vargas y García (1995) en pequeños brotes de *Spathiphyllum* sp (cola blanca) en presencia de 10 mg de BAP y de ANA.

Contaminación

En ocho de los 12 medios de cultivo utilizados se presentó contaminación en los explantes, a partir de explantes de botón con un mayor porcentaje en el medio T2 (25 %) (Tabla 4), sin embargo, a partir de explantes de tejido foliar la contaminación fue en todos los medios de cultivo en un 40 % en los medios T10 y T12 (Tabla 5). Hernández-Mendoza *et al.* (2014) en explantes de cormo obtuvieron el 100 % de explantes contaminados, en yemas vegetativas en un 31 % en cultivos de yemas tratadas con solución de hipoclorito de sodio al 70 %. En cultivos *in vitro* de cormos de nardo se logró controlar la contaminación cortando la porción infectada y tratando con Bavistin, mientras que agregar el antibiótico estreptomina en el medio fue

para controlar la contaminación bacteriana (Khanchana *et al.*, 2019).

La contaminación causada por diversos tipos de microorganismos (hongos, bacterias, virus y fitoplasmas) es uno de los principales problemas en el cultivo de tejidos vegetales, el medio de cultivo tiene las condiciones físicas de incubación favorables para el desarrollo de estos microorganismos (Mroginski *et al.* 2004).

Desarrollo de plantas y raíces en los cultivos obtenidos a partir de botón floral

En 7 de los 12 medios de cultivo utilizados, se observó el desarrollo de raíces, en mayor porcentaje en los medios T8 (7.5 %), T1 y T9 (6.6 %), T7 (4.3 %) y T6 (4.2 %) (Tabla 3.).

En los brotes regenerados en los medios indicados en la Tabla 3, no se generaron raíces vigorosas en el periodo de incubación de cuatro meses, pero, al cambiar los cultivos al medio de cultivo base GC que contenían los reguladores de crecimiento BAP (0.1 mg) y AIB (1.0 mg), se logró la inducción de raíces vigorosas en un periodo adicional de incubación de un mes.

Cultivos con desarrollo de tejidos de tépalos

En la mayoría de los medios de cultivo, a partir de botón floral desarrollaron tépalos (Tabla 3). El mayor porcentaje se obtuvo en el medio T3 (40 %), los cuales crecían siete veces del explante original, a los 60 días después del establecimiento del cultivo aséptico (Figura 3 A), posteriormente los cultivos se marchitaron y degeneraron.

Tabla 4. Tipo de respuesta y contaminación observados en los cultivos de *Polianthes tuberosa* generados a partir de explantes de botón. Los datos son expresados en porcentajes y desviación estándar (±).

Medio de cultivo	Contaminación	Cultivos sin diferenciación celular	Cultivos con desdiferenciación:	
			Proembriones	Callo
T1	24.2±1.0 ab	42.9±1.3 e	2.2±0.6 cd	11.0±0.6 d
T2	25.0±0.6 a	64.4±0.6 cd	1.1±0.5 d	16.7±0.5 cd
T3	4.2±0.5 c	33.9±0.5 e	13.9±0.8 a	8.7±0.6 d
T4	4.1±0.5 c	65.2±1.3 b	8.7±0.6 b	8.7±0.6 d
T5	7.5±0.5 c	77.5±0.6 b	0.0±0.0 d	22.5±0.5 b
T6	20.8±0.5 b	41.1±1.0 f	15.8±0.5 a	39.0±0.5 a
T7	4.2±0.5 c	59.1±1.8 bc	8.7±0.5 b	13.9±0.8 c
T8	0.0±0.0 d	77.5±1.3 a	1.7±0.6 cd	1.7±0.6 e
T9	4.1±0.5 b	64.3±1.0 b	6.1±0.5 bc	8.6±0.6 d
T10	0.0±0.0 d	54.2±1.0 bcd	10.0±0.8 ab	13.3±0.0 c
T11	0.0±0.0 d	47.5±0.5 d	7.5±0.5 b	15.8±0.5 c
T12	0.0±0.0 d	50.8±0.5 cd	10.0±0.8 ab	15.0±1.0 c

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas p≤0.05

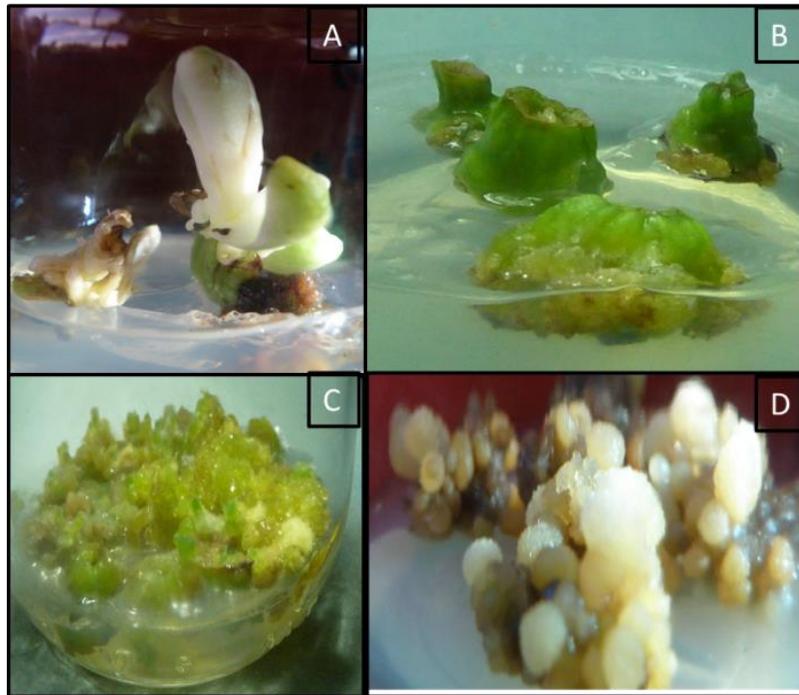


Figura 3. Aspecto del tipo de desarrollo observado en los cultivos generados a partir de explantes de tejido de botón de *Polianthes tuberosa*. Desarrollo de tépalos en el medio T3 a los dos meses de cultivo (A). Desarrollo de callo color verde en el medio T6 al mes de cultivo (B). Desarrollo de proembriones en el medio T6 a los cinco meses de cultivo (C) y aspecto de los callos color blanco marfil en el medio T5 al mes de cultivo (D).

Cultivos con desarrollo de callo

En los 12 medios utilizados los explantes también desarrollaron callo, lo cual es una expresión importante ya que estos cultivos de células indiferenciadas son utilizados para la manipulación genética o para la producción de compuestos secundarios (Cai *et al.*, 2012). El desarrollo de callo en los tejidos de botón, fue aparente al mes de establecidos los cultivos y se observó en mayor proporción (39.0 %) en los explantes cultivados en el medio T6 y en el medio T5 (22.5 %) (Tabla 4) ambos medios contenían 2,4-D. Los resultados muestran que la combinación de 2,4-D y BAP resultó ser el más efectivo para la inducción de callos en nardos que la combinación de BAP y ANA. La auxina 2,4-D es usada para la inducción de callos tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas (Evans *et al.* 1981).

Los callos tuvieron en algunos casos tonalidades de color verde en los que se generaron sobre su superficie estructuras proembriogénicas (Figuras 3 B y 3 C); sin embargo, esto no pudo comprobarse debido a que al ser subcultivados se transformaron gradualmente en callo. El desarrollo de proembriones se observó en mayor grado en cultivos desarrollados en los medios T6 (15.8 %) y T3 (13.9 %) (Tabla 4). Los explantes

establecidos en el medio T5, generaron un tipo de callo (22.5 %) de apariencia muy peculiar de color blanco marfil que nunca desarrollaron estructuras proembrionicas ni de otro tipo (Figura 3 D), ya que los callos que desarrollaron los explantes en los otros medios indicados en la Tabla 4, fueron de tonalidad verde, el cual indica un buen desarrollo y balance nutrimental en el medio de cultivo (Bautista *et al.*, 2020). Otsuji *et al.* (1994) obtuvieron callos a partir de tépalos de *P. tuberosa* en el medio MS que contenía altas concentraciones (2.61 y 2.25 mg) de 2,4-D, para la obtención de metabolitos.

Cultivos de explantes de tejido foliar

La regeneración de brotes a partir de tejido de hojas maduras que provenían de plantas cultivadas en invernadero no pudo lograrse (Tabla 5) aunque en todos los medios se generaron callos, resaltando esta respuesta en los cultivos desarrollados en los medios T11 (50.9 %) y T2 (40.3 %). El desarrollo de estructuras proembriogénicas también fue observado en estos cultivos, en mayor porcentaje en los cultivos desarrollados en los medios T1 (11.5), T3 (8.8) y en menor proporción en los medios T11 y T2 (Tabla 5, Figura 4).

Tabla 5. Tipo de respuesta y contaminación observada en los cultivos de *Polianthes tuberosa* generados a partir de explantes de tejido foliar. Los datos son expresados en porcentajes y desviación estándar (\pm).

Medio de cultivo	Contaminación	Cultivos sin diferenciación celular:	Cultivos con desdiferenciación celular:	
			Proembriones	Callo
T1	35.0 \pm 1.2 ab	69.2 \pm 0.8 bcd	11.5 \pm 0.6 a	19.2 \pm 0.6 cd
T2	22.5 \pm 0.6 cd	56.5 \pm 1.0 cd	3.2 \pm 0.6 ab	40.3 \pm 0.5 a
T3	15.0 \pm 0.0 d	66.2 \pm 0.5 ab	8.8 \pm 1.0 a	25.0 \pm 1.0 b
T4	31.3 \pm 1.3 bc	70.9 \pm 1.0 abc	0.0 \pm 0.0 b	29.1 \pm 0.8 bc
T5	7.5 \pm 0.5 c	77.5 \pm 0.6 b	0.0 \pm 0.0 d	22.5 \pm 0.5 b
T6	38.8 \pm 1.0 ab	81.6 \pm 1.8 abc	0.0 \pm 0.0 b	18.4 \pm 0.5 d
T7	42.5 \pm 1.3 a	100.0 \pm 0.6 a	0.0 \pm 0.0 b	0.0 \pm 0.0 e
T8	22.5 \pm 0.6 cd	75.8 \pm 1.3 a	0.0 \pm 0.0 b	24.2 \pm 1.0 bcd
T9	31.3 \pm 1.4 bc	52.7 \pm 0.5 de	0.0 \pm 0.0 b	47.3 \pm 0.6 a
T10	40.0 \pm 0.8 ab	66.7 \pm 0.8 cde	0.0 \pm 0.0 b	33.3 \pm 0.8 bc
T11	33.8 \pm 1.0 ab	45.3 \pm 0.0 e	3.8 \pm 0.6 ab	50.9 \pm 0.5 a
T12	40.0 \pm 0.8 ab	81.3 \pm 1.0 abc	0.0 \pm 0.0 b	18.8 \pm 0.5 d

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas $p \leq 0.05$

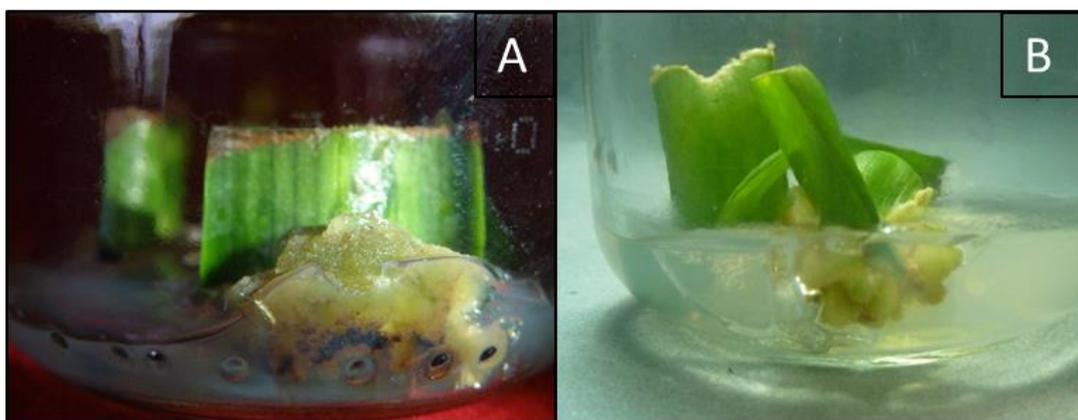


Figura 4. Aspecto de callos regenerados en los cultivos desarrollados a partir de tejido foliar en el medio T6 a los dos meses de cultivo (A) y de proembriones desarrollados a partir de tejido foliar en el medio T1 a los dos meses de cultivo (B).

Estos resultados demuestran que la organogénesis *in vitro* depende del tipo de explante, reguladores del crecimiento vegetal y su concentración.

Los resultados obtenidos en esta investigación pueden considerarse como preliminares y en la actualidad se están determinando las condiciones experimentales para definir el método práctico, económico y seguro que permita la regeneración masiva de plántulas a partir de cada tipo de órgano de la planta. A la fecha, se tienen detectados aspectos del procedimiento que pueden mejorarse para incrementar notablemente la eficiencia del método de propagación como: a) Ajustar con mayor precisión la concentración de los reguladores de crecimiento BAP y ANA. b) El proceso de desinfección de las muestras de botón se debe modificar para evitar el daño que le causan las sustancias utilizadas durante este proceso y, con respecto a la hoja, c) Se debe utilizar tejido foliar de hojas inmaduras ya que el resultado negativo obtenido

se puede atribuir a que las hojas utilizadas estaban lignificadas. En estudios realizados con *Stevia rebaudiana*, Besspalhok-Filho *et al.* (1993) utilizaron hojas jóvenes y lograron embriones somáticos en forma directa.

Si la regeneración masiva de plántulas a partir de cada tipo de órgano de la planta se logra, entonces es factible rescatar mutantes somáticas que se detecten en las plantas mediante mutaciones generadas de manera espontánea o inducida. Debemos considerar que el nardo es propagado, de manera comercial, a partir de cormo por lo que el grado de variabilidad que presenta es muy restringido. En general, se puede afirmar que la mayoría de los cultivos económicamente importantes son, desde el punto de vista genético muy uniformes, porque son originados a partir de unas cuantas líneas puras y, en consecuencia, son altamente vulnerables a la acción de los agentes bióticos y abióticos adversos. En particular el cultivo de nardo es producto de clones

con características bien definidas y además, la propagación se lleva a cabo de manera vegetativa, prácticamente en ausencia de recombinación genética, por lo que este cultivo al ser atacado por algún agente biótico o abiótico adverso tiene mayores posibilidades de ser dañado.

Este trabajo constituye una parte metodológica importante que permitirá implementar un procedimiento altamente eficiente de regeneración de plantas de nardo que acoplado a un procedimiento eficiente de inducción de mutaciones que se está definiendo experimentalmente, se podrían generar cambios en la coloración, forma, tamaño y perfume de la flor, tamaño de la planta, morfología y pigmentación de las hojas, grado de tolerancia a los factores bióticos y abióticos más comunes en este cultivo.

CONCLUSIONES

La inducción y desarrollo de brotes fue observada en los medios que contenían BAP (4.5 mg L⁻¹) y ANA (0.1 mg L⁻¹). El desarrollo de proembriones en cultivos de tejido foliar se logró en los medios que contenían también BAP (4.5 mg L⁻¹) y ANA (0.1 mg L⁻¹).

Agradecimientos

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo de la beca concedida (424576) que permitió, en parte, la realización de esta investigación.

Financiamiento. Este trabajo se desarrolló con presupuesto a la investigación otorgado por el Colegio de Postgraduados y con beca otorgada por CONACYT a Fanny Hernández Mendoza.

Conflicto de intereses. Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses relacionados con esta publicación.

Cumplimiento de estándares de ética. La investigación fue realizada y presentada por los autores bajo principios éticos y responsabilidad científica en el manejo de los datos.

Disponibilidad de datos. Los datos están disponibles con el autor de correspondencia (hernandez.fanny@colpos.mx; fan298a@hotmail.com), con previa solicitud.

REFERENCIAS

Bautista, J., Hernández-Mendoza, F., García-Gaytán, V. 2020. Impact on Yield, Biomass, Mineral Profile, pH, and Electrical Conductivity of Cherry Tomato Fruit Using a Nutrient

Solution and a Silicon-Based Organomineral Fertilizer. *Advances in Agriculture*, 2020. 7 pages. <https://doi.org/10.1155/2020/8821951>

Benschop, M. 1993. *Polianthes*. En: eds. de Hertogh A. y Le Nard M., *The physiology of flower bulbs*, edit. Elsevier Publ., Amsterdam, The Netherlands, pp. 589-601, <https://hal.inrae.fr/hal-02846900>.

Bespalhok-Filho, J. C., Hashimoto, J. M., and Vieira, L. G. E. 1993. Induction of somatic embryogenesis from leaf explants of *Stevia rebaudiana*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 5(1), 51-53.

Beyrami, Z., Azadi, E., Safari, P., Shafii, A., Reza, M., Sadeqi, S. 2008. Study on somaclonal variation in *Polianthes tuberosa in vitro* culture. *The National Ornamental Plant Research Station, Mahallat (Iran)* 30724: 102. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IR2010000115>

Bindhani, B. K., Dalal, A. K., Behara, B. 2004. Role of auxins for callus induction and chromosomal variation in *Polianthes tuberosa* L. 'Single'. *International Journal of Genetics and Plant Breeding*, 64(2), 173-174.

Bose, T. K., Jana, B. K., Moulik, S. 1987. A note on the micropropagation of tuberose from scale stems section. *Indian Journal of Horticulture*, 44, 100-101. https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=A+note+on+the+micropropagation+of+tuberose+from+scale+stems+section.+&btnG=

Cai, Z., Kastell, A., Smetanska, I. 2012. Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. *Plant Cell Reports*, 31(3), 461-77. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1165-0>

Castilla, V. Y., González, M. E. V., Lara, R. M. R. 2014. Determinación de estabilidad genética en vitroplantas de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.), micropropagadas con Biobras-16. *Cultivos Tropicales* 35(1), 67-74. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193230069010>

Estrada-Basaldúa, J. A., Pedraza-Santos, M. E., Torres, E. de la C., Martínez-Palacios, A., Sáenz-Romero, C., Morales-García, J. L. 2011. Efecto de rayos gamma ⁶⁰Co en nardo ("*Polianthes tuberosa*" L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, ISSN 2007-0934, N°. Extra 3, págs. 445-458.

- http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342011000900004.
- Evans, D. A., Sharp, W.R., Filck, C. E. 1981. Growth and behavior of cell culture: embryogenesis and organogenesis. In: Thorpe TA (ed) Plant tissue culture: method and applications in agriculture. Academic press, New York, pp 45–113
- Gajbhiye, S. S., Tripathi, M. K., Vidya, M. S., Singh, M., Baghel, B. S., Tiwari, S. 2011. Direct shoot organogenesis from cultured stem disc explants of tuberose (*Polianthes tuberosa* Linn.). Journal of Agricultural Technology, 7(3), 695-709. http://ijat-aatsea.com/pdf/May_v7_n3_11/14%20IJAT_2010_83%20FJ-R.pdf
- Gi, H. S., Tsay, H. S. 1989. Anther culture and somaclonal variation of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). Journal of Agricultural Research China, 38, 346-352. <https://eurekamag.com/research/001/756/001756483.php>
- Hernández-Mendoza, F., Carrillo-Castañeda, G., Pedraza-Santos, M. E., Torres, E. de la C., Mendoza-Castillo, Ma. del C. 2014. Regeneración *in vitro* de brotes de *Polianthes tuberosa* L. a partir de yemas vegetativas de la inflorescencia y de tejido de cormo. Revista Electrónica Nova Scientia, 7(1), 32 – 47. <https://www.redalyc.org/pdf/2033/203332667003.pdf>.
- Hutchinson, M. J., Onamu, R., Obukosia, S. 2004. Effect of Thidiazuron, Benzylaminopurine and Naphthalene Acetic acid on *In vitro* propagation of Tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) from shoot tip explants. Journal of Agriculture, Science and Technology, 6(1), 48-59. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=AJ2013001267>.
- Kadam, G. B., Singh, K. P., Singh, A. K., Jyothi, R. 2010. *In vitro* regeneration of tuberose through petals and immature flower buds. Indian Journal of Horticulture, 67(1), 73-75. <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijh&volume=67&issue=1&article=016>
- Khan, N. H., Zaidi, N., Jabeen, S., Iqbal, J. 2000. Micropropagation potential of *Polianthes tuberosa* L bulbs, scales and leaves. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research, 43(2), 118-122. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20000312771>
- Khanchana, K., Kannan, M., Hemaprabha, K., Ganga, M. 2009. Standardization of protocol for sterilization and *in vitro* regeneration in tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). International Journal of Chemical Studies, 7(1), 236-241.
- Mishra, A., Pandey, R. K., Gupta, R. K. 2006. Micropropagation of tuberose (*Polianthus tuberosa* L.) cv. Calcattia double. Progressive Horticulture, 37, 226-236. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20000312771>
- Mroginski, L., Sansberro, E. Flaschland. 2004. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En: Echonique, V., C. Rubinsten y L. Mroginski (Eds.) Biotecnología y mejoramiento vegetal. Parte II. Capítulo 2. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina. P 37.
- Muralidhar, C. E., Mehta A. R. 1982. Clonal propagation of three ornamental plants through tissue Culture methods. Japanese Association of Plant Tissue Culture. Tokyo, 693-694. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302625245>
- Murashige, T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologi Plantarum, 15, 473-497. <http://files.florestal81.webnode.com/200000040-03153040fe/07%20Artigo%20MS%201962.pdf>
- Narayanswamy, S., Prabhudesai, V. R. 1979. Somatic pseudoembryogeny in tissue cultures of tuberose (*Polianthes tuberosa*). Indian Journal of Experimental Biology, 17, 873-875. <https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=PASCAL8010100947>
- Naz, S., Aslam F., Ilyas, S., Shahzadi, K., Tariq, A. 2012. *In vitro* propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa*). Journal of Medicinal Plants Research, 6(24), 4107-4112. <https://academicjournals.org/journal/JMPR/article-full-text-pdf/572178223766.pdf>
- Nazneen, S, Jabeen, M., Ilahi, I. 2003. Micropropagation of *Polianthes tuberosa* through callus formation. Pakistan Journal Botany, 35(1), 17-25. https://www.researchgate.net/publication/290489641_Micropropagation_of_Polianthus_tuberosa_Tuberose_through_callus_formation

- Otsuji, K., Honda, Y., Sugimura, Y., Takei, A. 1994. Production of polysaccharides in liquid cultures of *Polianthes tuberosa* cells. *Biotechnology Letters*, 16(9), 943-948. <https://doi.org/10.1007/BF00128630>
- Rajasekharan, V., Haripriya, K., Arumugam, S., Shakila, A. 2000. *In vitro* propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). Abstract published in Centennial conference on spices and aromatic plants: challenges and opportunities in the new century. pp 86-88. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20013114332>
- Rammamurthy, J., Venkataraman, S., Meera, R., Satkar, P., Chiririsa, A. J. M., Devi, P. 2010. Phytochemical investigation of *Polianthes tuberosa*. *International Journal of Pharm Tech Research* 2 (2), 1204-1206.
- Ranchana, P., Kannan, M., Jawaharlal, M (2013). Genetic and correlation studies in double genotypes of tuberose (*Polianthes tuberosa*) for assessing the genetic variability. *Adv Crop Sci Tech* 1:109. doi:10.4172/2329-8863.1000109
- Rodríguez, C. D. 1988. Biotecnología y producción agroalimentaria. *Problemas del Desarrollo* 19(74): 19-20. https://scholar.google.es/scholar?cluster=1489503523888130410&hl=es&as_sdt=0,5
- Sangavai, C., Chellapandi P. 2008. *In vitro* Propagation of a Tuberose Plant (*Polianthes tuberosa* L.). *Electronic Journal of Biology*, 4(3), 98-101.
- Shen, T. M., Cowen, R. D., Meyer M. M. (1991). *In vitro* propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). *Horticultural Science*, 26(6), 756-756. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.484.8382&rep=rep1&type=pdf>
- Shillo, R. 1992. The cuber community holds the answer to flowering problems in *Polianthes tuberosa*. *Acta Horticulturae*. 325, 139-364. https://www.actahort.org/books/325/325_15.htm
- Sirohi, U., Kumar, M., Singh, S. K., Chauhan, P., Kumar, R. and Chand, P. 2018. Study on genetic variability, heritability, genetic advance and character association in tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) genotypes. *Hort Flora Research Spectrum*. 7(2): 109-114. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20183388879>
- Singh, P. K., Kumar, V., Nangbam, D., Sadhukhan R. 2019. Estimation of variability and diversity in tuberose (*Polianthes Tuberosa*.) genotypes. *Restaurant Business*. 118 (9): 1517-1531. https://www.researchgate.net/publication/339325762_Estimation_of_Variability_and_Diversity_in_Tuberose_Polianthes_Tuberosa_L_Genotypes
- Statistical Analysis System. 2002. Institute Inc. SAS/STAT. User's Guide. Versión 9.0. Cary, N. C.
- Vargas, E. T., García E. de 1995. Propagación *in vitro* de cala blanca *Spathiphyllum* sp. *Agronomía Tropical*, 47(2), 171-183.