

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE EASTER LILIES (*Lilium longiflorum* L.)

Arletys Santos Pino*, Jorge López Torres, Nery Montano Pérez, Milagros Basail Perez, Aymé Rayas Cabreras, Yenisey Gutierrez Sánchez, Dayana Rodríguez González, Víctor Medero Vega, Yoel Beovides García, Daniel Rodríguez Pérez
Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo CP: 53000, Villa Clara, Cuba.

* Autora para la correspondencia: organog.biotec@inivit.cu

Recibido: 29 de octubre de 2019; Aceptado: 17 de diciembre de 2019

RESUMEN

Los *Lilium* son plantas que poseen flores de buena calidad y durabilidad, muy apreciadas por el consumidor y de alta demanda en el mundo, todo lo cual constituye un atrayente especial. Motivado por lo anterior, se realizó la presente investigación con el objetivo de establecer una metodología de regeneración de plantas a partir del establecimiento de ápices meristemáticos *in vitro* y la obtención de bulbos para su multiplicación. Se estudiaron diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio para la desinfección de los explantes (0,5 %; 1 % y 2,0 % (v/v)) durante 15 minutos. El establecimiento *in vitro* se realizó a partir de ápices meristemáticos incubados en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (sales y vitaminas), sacarosa (30 g.L⁻¹) complementado con diferentes concentraciones de 6-BAP (0,1; 0,2; 0,3 y 1,0 mg.L⁻¹). Para el enraizamiento se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) al 100 % y 50 % de sus sales, además de la adición de ANA (0,5 mg.L⁻¹) como una variante del medio que contenía el 50 % del medio de cultivo MS (1962). Los resultados alcanzados en la investigación posibilitaron el establecimiento *in vitro* del cultivar, seguido de la obtención de bulbos, los cuales fueron multiplicados en el medio de cultivo que contenía 1,0 mg.L⁻¹ de BAP donde se obtuvieron los mejores resultados. El medio de cultivo constituido por el 50 % de las sales de MS (1962) y suplementado con ANA propició el mayor número de raíces. La metodología desarrollada posibilitó un 98 % de sobrevivencia en la fase de aclimatización.

Palabras clave: aclimatización, coeficiente de multiplicación, micropropagación

IN VITRO PROPAGATION OF EASTER LILIES (*Lilium longiflorum* L.)

ABSTRACT

Liliums are plants that have flowers of good quality and durability, greatly appreciated by the consumer and of high demand worldwide, all of which is a special attraction. Motivated by the above, this research was carried out with the aim of establishing a methodology of regeneration of plants, from the establishment of *in vitro* meristematic apices and the obtention of bulbs for their multiplication. Different concentrations of sodium hypochlorite were studied for the disinfection of explants (0,5 %; 1 % and 2,0 % (v/v)) during 15 minutes. The *in vitro* establishment was carried out from meristematic apices incubated in the culture medium Murashige and Skoog (1962) (salts and vitamins), sucrose (30 g.L⁻¹) supplemented with different concentrations of 6-BAP (0,1; 0,2; 0,3 and 1,0 mg.L⁻¹). For rooting, the culture medium Murashige and Skoog (1962) was used at 100 % and 50 % of their salts, besides the addition of ANA (0,5 mg.L⁻¹), as

a variant of the medium containing 50 % of the culture medium MS (1962). The results achieved in the research allowed the *in vitro* establishment of the cultivar, followed by the obtention of bulbs, which were multiplied in the culture medium containing 1.0 mgL^{-1} of BAP, where the best results were obtained. The culture medium constituted by 50% of MS salts (1962) and supplemented with ANA, provided the highest number of roots. The methodology developed made possible a 98 % of survival at the acclimatization phase.

Keywords: acclimatization, multiplication coefficient, micropropagation

INTRODUCCIÓN

El género *Lilium*, perteneciente a la familia *Liliaceae*, son plantas herbáceas perennes y presentan bulbos compuestos por brácteas escamosas, incluye aproximadamente 100 especies (Pelkonen *et al.*, 2012). Cerca de 55 especies y 32 variedades de *Lilium* son nativas de China (Wu *et al.*, 2014), 21 especies en América del Norte y 10 especies en Europa y el Cáucaso (Pelkonen *et al.*, 2012).

En el extremo caulinar se desarrollan las flores, solitarias o en inflorescencias racimosas, que presentan seis tépalos muy vistosos, seis prominentes estambres con anteras grandes y versátiles y un largo pistilo. Los cultivares *longiflorum* poseen flores blancas en forma de trompeta con fragancia distintiva, y se pueden cultivar fácilmente durante todo el año (Zhou *et al.*, 2008; Hurrell *et al.*, 2010).

Se cultiva a nivel mundial como uno de los cultivos de flores y jardinería de corte y maceta más importantes, principalmente debido a las flores grandes, fragantes y multicolores con una larga vida útil (Van Tuyl *et al.*, 2011; Bakhshaie *et al.*, 2016).

Para obtener plantas libres de virus existen varias técnicas de cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro*. Las más conocidas son el cultivo de meristemas, la termoterapia y la quimioterapia, entre otras (Rosales *et al.*, 2018).

Aunque los protocolos de micropropagación se han desarrollado para las principales especies de *Lilium*, la mayoría no son suficientemente viables en laboratorios comerciales y una de las principales razones de esto es la formación inadecuada de bulbos (Askari *et al.*, 2018).

Atendiendo a lo anterior el objetivo de este trabajo fue establecer una metodología para la propagación *in vitro* de Easter lilies (*Lilium longiflorum* L.).

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) en el municipio de Santo Domingo, provincia de Villa Clara.

Procedimientos generales

Según el experimento, se emplearon tubos de ensayos (50 x 25 mm) con 10 mL de medio de cultivo y frascos de cristal (50 mL), con 15 mL de medio de cultivo, los cuales se colocaron en una cámara de cultivo a una temperatura de $27 \pm 2,0^\circ \text{C}$ e iluminación artificial mediante tubos fluorescentes, con régimen de 16 horas de luz a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de $62\text{-}68 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. El pH fue ajustado con NaOH 0,5 N y HCl 0,5 N, antes de la esterilización en autoclave.

El procesamiento de los datos se realizó con los paquetes estadísticos SPSS ver. 9.0. En cada experimento se detallan las pruebas realizadas.

Determinación de la concentración de hipoclorito de sodio para la desinfección del explante

Con el objetivo de determinar la concentración más adecuada para la desinfección del explante a utilizar (ápices meristemáticos) se utilizaron tres concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0,5%; 1% y 2,0% (v/v) durante 15 minutos en condiciones estériles en una cabina de flujo laminar, seguido de tres enjuagues con agua estéril. Se utilizaron 24 explantes por cada concentración de hipoclorito de sodio estudiada y fueron incubados en tubos de ensayos según se describió en los procedimientos generales en las condiciones de cultivo descritas anteriormente. Se evaluó la cantidad de explantes contaminados y se expresó los mismos en porcentaje.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el procedimiento no paramétrico Kruskal-Wallis con un nivel de significación de $p < 0,05$.

Establecimiento *in vitro* de los ápices meristemáticos

El establecimiento *in vitro* se realizó a partir de ápices meristemáticos (Fig. 1), los cuales fueron incubados en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (sales y vitaminas), sacarosa (30 g.L^{-1}) y suplementado con diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) ($0,1$; $0,2$; $0,3$ y $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) y solidificado con *gelrite* (2 g.L^{-1}), pH 5,7 durante 30 días de cultivo, incubados en las condiciones de cultivos señaladas en los procedimientos generales.



Figura 1. Explantes utilizados para el establecimiento *in vitro* del *Lilium*.

Los explantes fueron colocados en los frascos de cristal descritos en los procedimientos generales. Se evaluó el tipo de estructura presente (características del explante) y el coeficiente de multiplicación.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el procedimiento no paramétrico Kruskal-Wallis con un nivel de significación de $p < 0,05$.

Determinación del coeficiente de multiplicación durante tres subcultivos realizados

A partir del resultado obtenido del experimento anterior, con relación a la concentración más adecuada de 6-bencilaminopurina (BAP) para el establecimiento *in vitro* y su multiplicación, se evaluó el número de brotes durante tres subcultivos en cada uno de ellos.

La multiplicación de los mismos se realizó por secciones transversales de escama del bulbo de algunos milímetros de espesor según Askari (2016). Se utilizaron 24 explantes en cada subcultivo estudiado.

Las condiciones de cultivo y frascos utilizados fueron las descritas en procedimientos generales.

Los resultados fueron evaluados según el análisis estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis con un nivel de significación de $p < 0,05$.

Influencia del medio de cultivo en la fase de enraizamiento

Con el objetivo de determinar la influencia del medio de cultivo en el enraizamiento del explante se evaluó el número de raíces producidas en cada medio de cultivo estudiado, a partir de una muestra de 15 explantes.

Los medios de cultivos estudiados fueron:

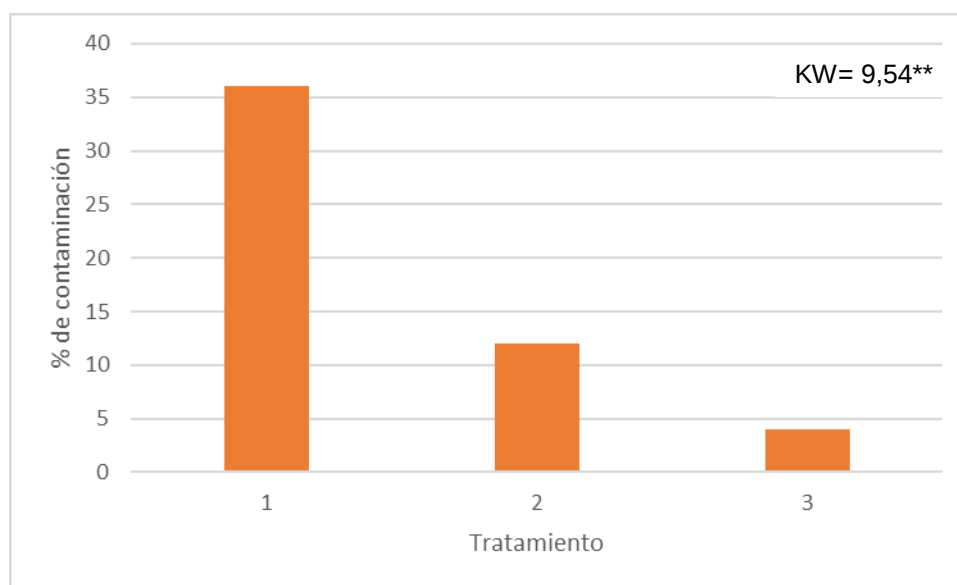
1. Murashige y Skoog (MS) (1962) (sales y vitaminas) 100% y sacarosa (30 g.L⁻¹), pH 5,8 y solidificado con gelrite (2 g.L⁻¹)
2. Murashige y Skoog (MS) (1962) (sales y vitaminas) 50% y sacarosa (30 g.L⁻¹), pH 5,8 y solidificado con gelrite (2 g.L⁻¹)
3. Murashige y Skoog (MS) (1962) (sales y vitaminas) 50%, sacarosa (30 g.L⁻¹) y ANA (0,5 mg.L⁻¹), pH 5,8 y solidificado con gelrite (2 g.L⁻¹)

Las condiciones de cultivo fueron las descritas en procedimientos generales y colocados en los frascos de cristal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la concentración de hipoclorito de sodio para la desinfección del explante

Al evaluar la concentración de hipoclorito de sodio para la desinfección del explante se pudo observar que existió diferencia significativa entre los tratamientos evaluados (Fig. 2) resultando el mejor tratamiento cuando se utilizó la concentración de 2% de hipoclorito de sodio donde solo se contaminó el 4% de los explantes establecidos, seguido por la concentración del 1% de hipoclorito de sodio donde se contaminó el 12% de los explantes iniciados. Según De Klerk *et al.* (2014), los contaminantes pueden originarse de dos fuentes distintas, primeramente, aquellos que vienen en la superficie o en los tejidos de la planta donadora y en segundo lugar los que aparecen como resultado de fallas en los procedimientos de laboratorio.



Leyenda: 1 (Desinfección con hipoclorito de sodio al 0,5 %), 2 (Desinfección con hipoclorito de sodio al 1 %), 3 (Desinfección con hipoclorito de sodio al 2 %)

Figura 2. Concentraciones de hipoclorito de sodio utilizadas para la desinfección del explante en el establecimiento *in vitro* de *Lilium*.

La superficie de los tejidos de las plantas constituye hábitats para los microorganismos, los cuales pueden alojarse en estomas, lenticelas o cualquier otra abertura natural, lo cual dificulta en extremo la eliminación de los mismos. Las formas de eliminar o evitar los microorganismos endógenos son muy limitadas. El primero es un tratamiento de termo terapia que mata los microorganismos, pero no los tejidos vegetales. Este método solo puede usarse en tejidos vegetales robustos, como bulbos y brotes no germinados, y a menudo no tiene éxito entre otros porque las esporas latentes sobreviven e incluso se activan. La segunda forma es comenzar con tejidos que estén libres de microorganismos. En particular, los meristemos están libres de microorganismos (De Klerk *et al.*, 2014).

Xiao *et al.* (2017) utilizaron para el establecimiento *in vitro* de *Lilium cernuum* el hipoclorito de sodio (2 %) durante 12 minutos. Mientras que De Klerk *et al.* (2014) utilizaron el hipoclorito de sodio (1 %) durante 30 minutos y luego realizaron los enjuagues con hipoclorito de sodio (0,03 %) en lugar de agua.

Establecimiento *in vitro* de los ápices meristemáticos

Durante el primer mes de cultivo los explantes duplicaron su grosor y fueron observados tres tipos de estructuras (Fig. 3), brotes bien definidos, formados por pequeños bulbos con la presencia en algunos casos de pequeños vástagos, que emergen del bulbo similares a los descritos por Sahoo *et al.* (2018), estructuras que solo engrosaron y con presencia de algunas zonas verdes sin desarrollo organogénico y por último estructuras con desarrollo del ápice sin llegar a definirse el brote y rodeado de un callo.



Figura 3. Estructuras formadas a los 30 días de cultivo durante la etapa de establecimiento *in vitro* del *Lilium*.

Aswath *et al.* (2001) al referirse al método de establecimiento *in vitro* por cultivo de meristemos señalaron que aproximadamente 70 cultivares de *Lilium* habían sido introducidos exitosamente, agregando que no fue hasta 1971 que se informó la obtención de plantas libres de virus a través del cultivo de meristemos.

Al evaluar la influencia de los medios de cultivos suplementados con diferentes concentraciones BAP hubo una respuesta variada. Como se pudo observar (Fig. 4) en el medio de cultivo constituido por 1 mg.L^{-1} se obtuvieron los mejores resultados al evaluar el coeficiente de multiplicación de los mismos con diferencias significativas del resto de los tratamientos estudiados.

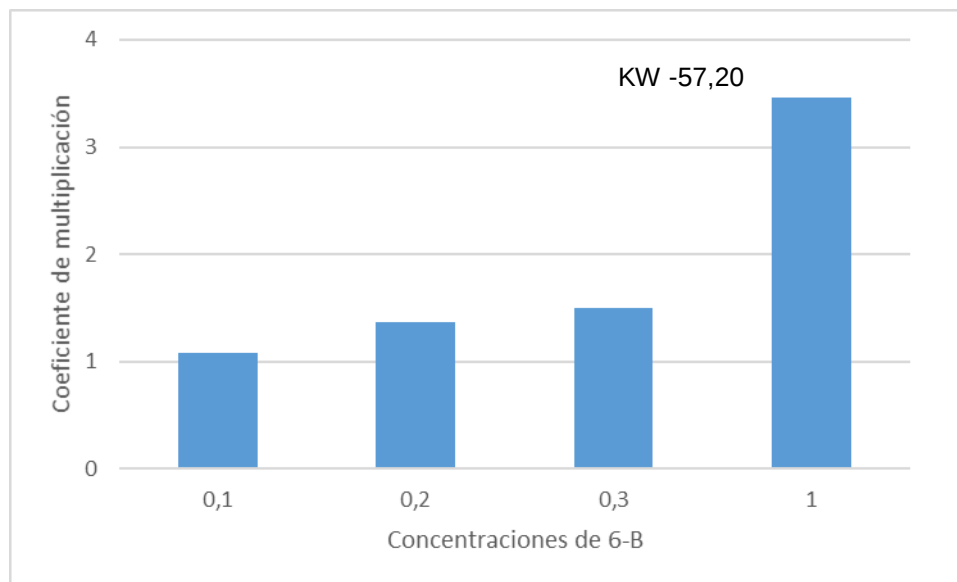


Figura 4. Influencia del medio de cultivo en la etapa de establecimiento *in vitro* de *Lilium* en relación con el coeficiente de multiplicación.

Las estructuras evaluadas se caracterizaron por ser bulbos de color verde intenso formados por varias escamas, lo cual constituyó el explante seleccionado para su propagación *in vitro*, utilizado también por otros autores en este género (Ishioka y Tanimoto, 1990).

Sahoo *et al.* (2018) lograron el establecimiento *in vitro* del cultivar Shirui lily (*Lilium mackliniae* Sealy) utilizando $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP en el medio de cultivo.

Determinación del coeficiente de multiplicación durante tres subcultivos realizados

Como se puede observar en la Tabla 1, a medida que aumentó el número de subcultivo hasta el tercero se pudo apreciar un aumento del coeficiente (11 bulbos) con diferencias significativas del resto de los dos subcultivos anteriores que se comportaron entre 5,4 y 6 bulbos (Fig. 5).

Tabla1. Coeficiente de multiplicación de *Lilium* durante tres subcultivos en el medio de cultivo MS (1962) suplementado con 1 mg.L^{-1} de 6-BAP.

Tratamientos	Coeficiente de multiplicación	Media de rango
1	5.4	57.792 a
2	6	28.604 b
3	11	23.104 b

KW = 38,8207*

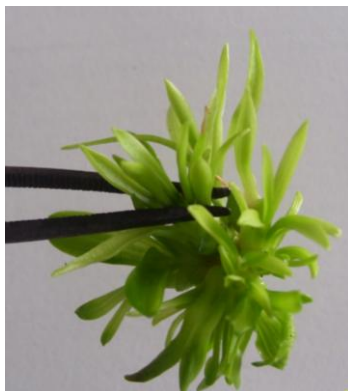


Figura 5. Explantes de *Lilium* en tercer subcultivo de multiplicación en el medio de cultivo MS (1962) suplementado con 1 mg.L^{-1} de 6-BAP.

Relacionado con los índices de multiplicación Gerrits (1992) y Gerrits y De Klerk (1992) cuando multiplicaron la especie *L. speciosum* en la oscuridad lograron incrementar el tamaño de los bulbos a expensas del número y tamaño de las hojas. También otros autores como Stimart y Ascher (1978) en las mismas condiciones de oscuridad aumentaron el número de bulbos diferenciados.

Xiao *et al.* (2017) lograron un coeficiente de multiplicación de 2.03 utilizando la combinación de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP y $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA en el medio de cultivo, para la multiplicación del *Lilium cernuum*.

Sahoo *et al.* (2018) obtuvieron 3.5 brotes por explantes al utilizar el medio de cultivo enriquecido con $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP y $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AG_3 en el cultivar 'Shirui lily' (*Lilium mackliniae* Sealy).

Seon *et al.* (2000) han propuesto una técnica de propagación en masa en biorreactores para híbridos orientales y señalaron además que el cultivo en biorreactores con suplementación periódica de medio de cultivo es un método eficaz para la producción en masa de bulbos de *Lilium* en términos de economía, de mano de obra y de tiempo.

Influencia del medio de cultivo en la fase de enraizamiento

Al evaluar la presencia de raíces en los medios de cultivo estudiados, se determinó que la mejor variante con diferencias significativas del resto de los tratamientos estudiados fue el medio de cultivo que contenía $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA con 20 raíces como media de la plántula regenerada (Tabla 2).

Tabla 2. Influencia del medio de cultivo en el enraizamiento de los explantes de *Lilium* en diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo utilizado	Cantidad de raíces	Media de rangos
MS-100%	13,0	27,542 a
MS-50%	18,16	21,167 a
MS-50% +0,5 ANA	20,0	6,791 b
Kw =24,767*		

Sin embargo, cuando se utilizó el medio de cultivo MS (1962) al 100% de la concentración de sus sales y desprovisto de reguladores del crecimiento, los bulbos se elongaron, siendo necesario para la diferenciación en plántula, un subcultivo posterior. Resultados similares fueron obtenidos por Duong *et al.* (2006) al utilizar el ANA en el enraizamiento *in vitro* del *Lilium* a partir de la formación de bulbos.

Sahoo *et al.* (2018) obtuvieron los mejores resultados en el enraizamiento de las plantas cuando utilizaron 0,5 mg.L⁻¹ de ANA.

Cuando fueron transferidas las plántulas a la fase de aclimatización se logró obtener un 98% de sobrevivencia de las plantas producidas *in vitro* (Fig. 6). Resultados similares también fueron obtenidos durante esta fase por Chen *et al.* (2000) y Duong *et al.* (2006) cuando obtuvieron una sobrevivencia de 97 y 98 % respectivamente.



Figura 6. Plantas producidas *in vitro* de *Lilium* en fase de aclimatización, listas para ser transferidas a condiciones de campo.

Los resultados alcanzados posibilitaron el establecimiento de una metodología para la propagación del *Lilium* a partir del establecimiento *in vitro* de los ápices meristemáticos seguido de la multiplicación de los bulbos y su posterior transferencia a la fase de aclimatización.

CONCLUSIONES

1. Se estableció una metodología para la regeneración de plantas por organogénesis (bulbos) del *Lilium*.
2. Los coeficientes de multiplicación obtenidos por organogénesis y su posterior regeneración de plantas posibilitaron incrementar los volúmenes de material de propagación.
3. Se logró un 98 % de supervivencia en las plantas evaluadas durante la fase de aclimatización.

BIBLIOGRAFIA

- ASKARI, N. 2016. Aspects of bulblet growth of lily *in vitro*. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, NL. 130pp. ISBN: 978-94-6257-760-2. DOI: 10.18174/375959
- ASKARI, N.; R. VISSER and G. DE KLERK. 2018. Growth of lily bulblets *in vitro*, a review. International Journal of Horticultural Science and Technology. International Journal of Horticultural Science and Technology, 5(2): 133-143.
- ASWATH, C.; D. NHUT and V. BUL. 2001. *Lilium*. In: Biotechnology of Horticultural Crops. Vol. 3. In: Parthasarathy, V.A.; T.K. Bose and R. Das (eds). Calcuta, India.
- BAKHSHAI, M.; S. KHOSRAVI; P. AZADI; H. BAGHERI and M.J. VAN TUYL. 2016. Biotechnological advances in *Lilium*. Plant Cell Rep, 35(1):799-826.
- CHEN C.; Y.U. CHEN-TERRN and S. WE-CHIN. 2000. A tissue culture protocol for propagation of rare plant, *Lilium speciosum* Tunb. var. gloriosoides Baker. Bot. Bull. Acad. Sin., 41:139-142.
- DE KLERK, G.; N. VAN DER REST and N. ASKARI. 2014. Standard procedure contaminates lily. Propytha annual: 30-33.
- DUONG, T.N.; T. NGUYEN; T. NHUYEN; T.H. NGUYEN and D. NANG. 2006. Effects of lily genotype on regenerative ability via young stem transverse thin cell layer and bulb scale culture. Journal of Biotechnology, 4(2): 227-232.
- GERRITS, M. and G. DE KLERK. 1992. Dray matter partitioning between bulbs and leaves in plantlets of *Lilium speciosum* regenerated *in vitro*. Acta Bot. Neerl, 41(4):461-468.
- HURRELL, J.A.; G. DELUCCHI y J.A. TOLABA. 2010. Presencia de *Lilium longiflorum* (Liliaceae) adventicia en la Argentina. Bol. Soc. Argent. Bot., 45(1-2): 195-200.
- ISHIOKA, N. and S. TANIMOTO. 1990. Studies on bulblet differentiation in bulb-scale segments of *Lilium longiflorum*. I. Effects of wounding and traumatic acid. Bul. Fac. Agr., Saga Univ., 69: 27-33.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- PELKONEN, V.P. and A.M. PIRTILÄ. 2012. Taxonomy and phylogeny of the genus *Lilium*. In: Van Tuyl J.M. and P. Arens (eds). Floriculture & ornamental biotechnology. London: Global Science Books; p. 9-23.
- ROSALLES, M.; M. PAZ; E. FARIAS; A. VIDAL y N. VEGA. 2018. Virus en *Lilium*: La importancia de la sanidad del cultivo. Agronomía y forestall, 54: 45-48.
- SAHOO, M.; M. PREMI; M. DASGUPTA; N. PRAKASH and S. VANAIO. 2018. An efficient protocol for *in vitro* regeneration and conservation of Shirui lily (*Lilium mackliniae* Sealy): a lab-to-land approach to save the rare endangered Asiatic lily species. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9916-z>
- SEON, J.H.; Y.S. KIM; S.H. SON and K.Y. PAEK. 2000. The fed-batch culture system using bioreactor for the bulblet production of oriental lilies. Acta Hort., 520:53-59.
- STIMART, D.P. and P.D. ASCHER. 1978. Tissue culture of bulb scale sections for asexual propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 103:182-184.
- VAN, J.M.; P. ARENS; M.S. AMANNA; A. SHAHIN; N. KHAN; S. XIE; A. MARASEK-CIO-LAKOWSKA; K.B. LIM and R. BARBA-GONZALEZ. 2011. *Lilium*. In:

- Kole, Ch. (edt). Wild crop relatives: genomic and breeding resources, plantation and ornamental crops. Berlin: Springer. p. 161-208.
- WU, X.W.; M. TIAN; L.H. WANG; G.F. CUI; R.P. YU; Z.H. LU; W.J. JIA; S.P. QU; M. GUI and J.H. WANG. 2014. Native species of the genus *Lilium* in China. *Acta Hortic*, 10(27):27-40.
- XIAO, H.Y.; H. HAO and Q.L. LIU. 2017. Micropropagation and bulblet transplantation of *Lilium cernuum*. In: Wang, J.; D. Mu and W.B. Miller (eds). *Acta Hortic*. 1171. ISHS p. 17-24. DOI 10.17660/ActaHortic.2017.1171.3
- ZHOU, S.; M.S. RAMMANNA; R.G. VISSER and J.M. VAN. 2008. Analysis of the meiosis in the F1 hybrids of Longiflorum x Asiatic (LA) of lilies (*Lilium*) using genomic *in situ* hybridization. *Journal of Genetic and Genomic*, 32:687-695.