



Leaf-derived organogenesis from lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) in response to different plant growth regulators

Organogénesis a partir de hojas de lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) en respuesta a diferentes reguladores de crecimiento

Maribel Falcón-Bautista, José Manuel Rodríguez-Domínguez, Rodrigo Barba-González*

Área de Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Jalisco, México.

*Corresponding author.

E-mail address: rbarba@ciatej.mx (R. Barba-González).

Article history:

Received: 15 December 2017 / Received in revised form: 13 March 2018 / Accepted: 18 March 2018 / Published online: 1 April 2018.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.2.37>

ABSTRACT

Lisianthus' characteristics make it a cut flower of great interest, so the use of micropropagation techniques favors a rapid and massive multiplication, with plants free of pathogens. The organogenesis, resulted of use regulators of growth of different action mode (auxin, cytokinin and gibberellin), included the formation of shoots and roots that it was generated in some cases directly and in other from callus, employing the foliar segments as explant. The addition of low concentrations of cytokinin and gibberellin (1.0 mg/L benzyladenine (BA) + 0.5 mg/L gibberellic acid (GA₃)) to the culture medium were necessary to generate the highest number of shoots (14.16 shoots per explant).

Keywords: cut flower, direct organogenesis, shoots, roots.

RESUMEN

Las características del lisianthus la hacen una flor de corte de gran interés, por lo que es necesario generar conocimiento acerca de su producción empleando técnicas como la micropropagación favoreciendo una multiplicación rápida y masiva, con plantas libres de patógenos. La organogénesis, resultado de utilizar reguladores de crecimiento de diferente

modo de acción (auxina, citocinina y giberelina), incluyó la formación tanto de brotes como de raíces que se generaron en algunos casos de manera directa y en otros a partir de callo, utilizando segmentos foliares como explante. La adición de bajas concentraciones de citocinina y giberelina (1.0 mg/L benciladenina (BA) + 0.5 mg/L ácido giberélico (GA₃)) al medio de cultivo, fueron necesarias para generar el mayor número de brotes (14.16 brotes por explante).

Palabras clave: brotes, flor de corte, organogénesis directa, raíces.

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de la familia Gentianaceae, se encuentra el lisianthus (*Eustoma grandiflorum* [Raf.] Shinn sinónimo de *E. andrewsii*, *E. russellianum*, *Lisianthus russellianus*) (Harbaugh, 2006) que es una planta nativa de los estados del norte de México y sur de Estados Unidos, adaptada a condiciones de baja humedad relativa y temperaturas más altas que la mayoría de las flores cultivadas, a pesar de esto se le encuentra creciendo a lo largo del cauce de arroyos y ríos donde siempre tienen acceso al agua (De la Riva-Morales *et al.*, 2013). Es una planta que ofrece flores con una gama cromática muy amplia dentro de la que destacan el color blanco, rosa, morado, azul y amarillo (González, 2015).

En México, esta familia está representada por 17 géneros y aproximadamente 100 especies con elementos de origen tanto neártico como neotropical (Albor-Pinto *et al.*, 2016) de los 87 géneros y aproximadamente 1615-1688 especies registradas a nivel mundial (Vidari & VitaFinzi, 2010).

En el mercado florícola, el lisianthus se ha constituido como un cultivo popular de reciente introducción ocupando ya un puesto entre las diez flores de corte más vendidas en Europa en un período de tan solo 20-30 años, generando consumos de hasta 122 millones de tallos; debido a que presenta una diversidad de colores y patrones florales, flores de 6 a 8 cm de ancho y vida de florero de 10 a 15 días (Namesny, 2005; Harbaugh, 2006; González, 2015).

Debido al desconocimiento de la producción y manejo del cultivo de lisianthus, en México son muy pocos los productores que se dedican a esta labor, destinándose en el 2002 aproximadamente solo cuatro hectáreas para ello (González, 2015) distribuidas en cinco estados, evidenciándose la importancia de generar conocimiento acerca de su proceso de producción (Hernández, 2011).

Convencionalmente se propaga vegetativamente y por semilla; sin embargo el método de propagación vegetativa es muy laborioso y tardado; más aún la propagación por semilla no es eficiente debido a la baja tasa de germinación de las mismas y la deficiente calidad de la progenie (Winarto *et al.*, 2015). Gracias a las altas tasas de demanda del lisianthus, la micropropagación se hace una herramienta poderosa para la propagación a gran escala de plantas ornamentales como esta; ofreciendo la oportunidad de generar individuos vigorosos y libres de enfermedades en poco tiempo, los cuales serían difíciles de obtener por métodos de cultivo tradicionales (Clava & Pérez, 2005; Kaviani, 2014). Sin embargo, los estudios de micropropagación de lisianthus son relativamente escasos (Kaviani, 2014), lo cual puede deberse principalmente a que es un cultivo de reciente introducción. Aunque destacan los

trabajos realizados por Mousavi *et al.*, (2012a & 2012b), Rezaee *et al.*, (2012), Akabari *et al.*, (2014) y Winarto *et al.*, (2015).

Dada la importancia que representa el *lisianthus* para el mercado florícola y para fomentar su cultivo en México, se evaluaron diferentes reguladores de crecimiento usando hojas como fuente de explantes a fin de inducir organogénesis como respuesta.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Las semillas resultantes de diferentes cruces entre plantas pertenecientes a *E. grandiflorum* y *E. exaltatum* fueron proporcionadas por la Unidad de Biotecnología Vegetal, del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.

Para su establecimiento en condiciones *in vitro* se sometieron a un proceso de desinfección con alcohol etílico al 70% durante 1 minuto para adicionar posteriormente hipoclorito de sodio al 3% por 3 min, finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Se sembraron sobre medio de cultivo con vitaminas y sales MS (Murashige & Skoog, 1962) (marca Sigma) ajustando el pH a 5.8 ± 0.02 , previamente esterilizado a 121°C , 1 atm durante 20 min; las semillas se incubaron a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con fotoperiodo de 16 horas luz hasta su germinación. Posteriormente, las plántulas se individualizaron para que continuaran con su desarrollo bajo las condiciones de cultivo anteriormente mencionadas. Se utilizaron las hojas pertenecientes a plantas de 3 meses de edad como fuente de explantes.

2.2. Medio de cultivo

Segmentos de hoja de 1cm^2 fueron colocados en cajas Petri con medio MS utilizando diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento (Tabla 1) estableciéndose un diseño completamente al azar con 20 tratamientos; cada uno de los cuales consistió de cinco repeticiones con seis explantes. Se mantuvieron las condiciones de cultivo e incubación previamente citadas.

Tabla 1. Tratamientos generados por las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento a evaluar (mg/L).

NAA	BA + 0.5 GA ₃			
	0.0	0.5	1.0	1.5
0.0	T1	T2	T3	T4
0.5	T5	T6	T7	T8
1.0	T9	T10	T11	T12
2.0	T13	T14	T15	T16
3.0	T17	T18	T19	T20

2.3. Análisis estadístico

Se evaluaron porcentaje de explantes regenerados, número y altura de brotes, número y longitud de raíces a los 45 días de siembra. Los análisis estadísticos realizados fueron un análisis de varianza (ANOVA, $\alpha=0.05$) seguidos por una prueba de Tukey, con el fin de determinar las diferencias significativas entre los tratamientos. Dichos análisis se realizaron utilizando el programa de computación STATGRAPHICS Centurion XV.II (Statistical Graphics Corp.).

3. RESULTADOS

Se generaron diferentes tipos de respuesta en las hojas de *lisianthus* al ser expuestas a las combinaciones de reguladores de crecimiento (Fig.1). Se observó que en aquellos tratamientos que solo contenían BA y GA₃ se formaron brotes los cuales se generaron de manera directa a partir del explante (organogénesis directa), correspondiendo a los tratamientos T2, T3 y T4. Para el caso de los tratamientos a los que únicamente se les adicionó NAA y GA₃ formaron solamente estructuras radiculares pero, a diferencia del caso anterior, dichas raíces crecieron a partir de masas celulares o callo, haciendo referencia a los tratamientos T5, T9, T13 y T17. Para aquellos tratamientos establecidos con alguna concentración de NAA + BA + GA₃, particularmente para los tratamientos T7, T10, T12, T14-T16, T18 y T19 se observó la generación tanto de brotes como de raíces a partir de callo (organogénesis indirecta). En los tratamientos T6, T8, T11 y T20 se notó la regeneración de brotes pero también a partir de callo.

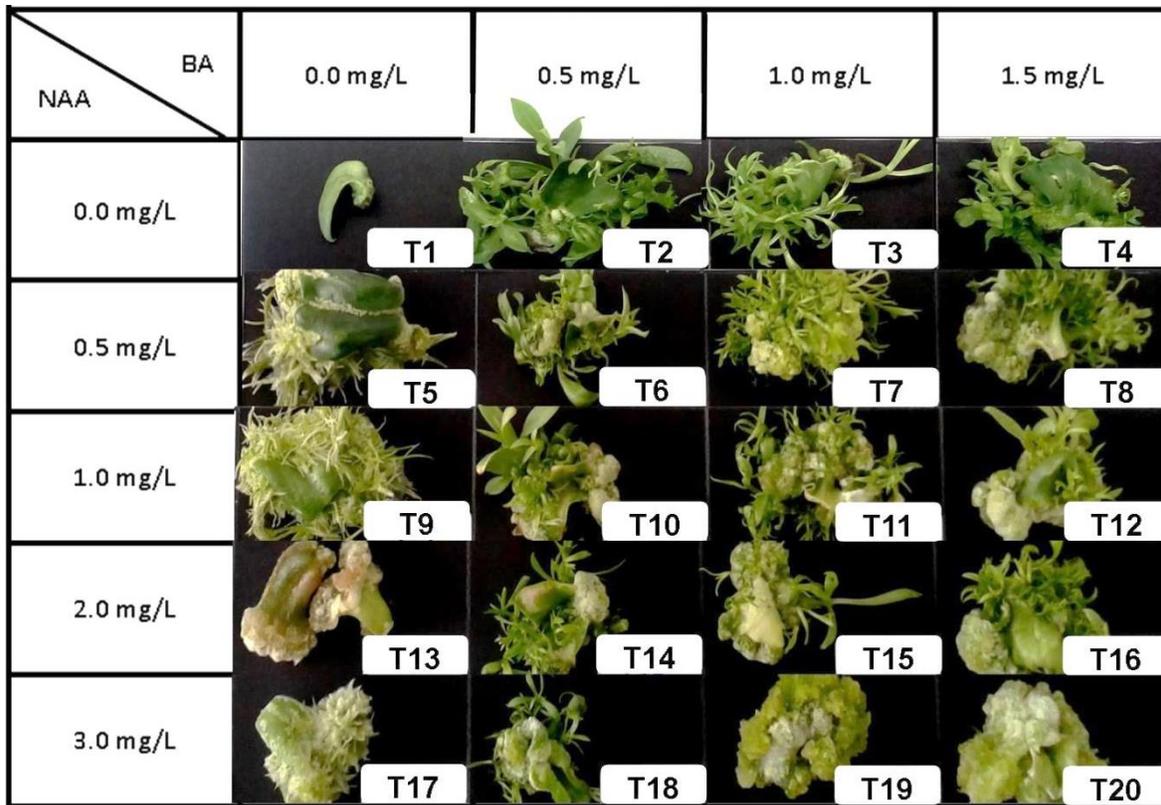


Fig. 1. Morfogénesis a partir de hojas de lisianthus. Formación directa e indirecta de brotes y raíces. T5, T9, T13 y T17 no presentaron formación de brotes; el resto de tratamientos generó tanto brotes como raíces (todos los tratamientos contienen 0.5 mg/L de GA₃).

Los datos de cada uno de los tratamientos se resumen en la Tabla 2, donde se puede observar que estadísticamente no existieron diferencias significativas en el porcentaje de explantes regenerados para cada una de las combinaciones de reguladores de crecimiento empleadas, a excepción del tratamiento control como era de esperarse. En cambio, el número de brotes fue diferente para cada uno, generándose la mayor cantidad al adicionar 1.0 mg/L BA + 0.5 mg/L GA₃ (T3 con 14.16 brotes por explante en promedio); además se formaron los brotes de mayor altura (1.53 cm en promedio por brote) con las mismas concentraciones de reguladores. Cabe mencionar que con la adición de auxina y giberelina como única fuente de fitohormonas a concentraciones de 0.5 - 3.0 mg/L de NAA + 0.5 mg/L GA₃, que corresponden a los tratamientos T5, T9, T13, T17 se logró solamente la formación de raíces directamente a partir del explante y en algunos casos a partir del callo (T13 y T17), obteniéndose el mayor número de raíces al adicionar 0.5, 1.0 mg/L NAA + 0.5 mg/L GA₃, siendo los tratamientos T5 y T9 con 15.16 y 11.56 raíces, respectivamente. Coincidiendo con esto, la mayor longitud de raíces (2.72 cm) se obtuvo en el tratamiento T5, que estadísticamente se consideró el mejor tratamiento utilizando la mínima concentración de reguladores (0.5 mg/L NAA + 0.5 GA₃).

Tabla 2. Efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre la formación de brotes y/o raíces de *lisianthus*.

T	E.R.	N.B.	A.B.	N.R.	L.R.
1	10 a	0.1 a	0.4 ab	0.10 a	1.28 a
2	83.33 b	10.06 efg	1.71 f	0.0 a	0.0 a
3	93.33b	14.16 g	1.53ef	0.0 a	0.0 a
4	83.33 b	9.76 efg	1.31 cdef	0.0 a	0.0 a
5	90b	0.23 a	0.64 abcd	15.16 c	2.72 b
6	90 b	11.73 fg	1.33 cdef	0.0 a	0.0 a
7	76.66 b	8.13 def	1.48 def	0.36 a	0.13 a
8	90 b	7.13 cdef	1.2 bcdef	0.0 a	0.0 a
9	90 b	0.0 a	0.0 a	11.56 c	1.14 a
10	100 b	5.66 bcde	1.30 cdef	0.9 ab	0.2 a
11	90 b	3.2 abcd	0.76 abcde	0.0 a	0.0 a
12	93.33 b	4.9 abcde	1.15 bcdef	0.7 a	0.17 a
13	96.66 b	0.0 a	0.0 a	1.36 ab	0.27 a
14	100 b	2.76 abc	0.59 abc	2.60 ab	0.22 a
15	83.33 b	1.70 ab	1.02 bcdef	1.76 ab	0.21 a
16	100 b	4.26 abcd	1.12 bcdef	0.76 a	0.3 a
17	76.66 b	0.0 a	0.0 a	5.73 b	0.58 a
18	100 b	2.86 abc	0.95 bcdef	3.46 ab	0.35 a
19	96.66 b	1.30 ab	0.58 abc	2.20 ab	0.22 a
20	90 b	1.36 ab	0.68 abcde	0.0 a	0.0 a
<i>F</i>	6.05	17.61	9.21	18.17	6.03
<i>SE</i>	0.422	1.037	0.171	0.960	0.266

T: tratamiento; E.R: porcentaje de explantes regenerados; N.B: número de brotes promedio; A.B: altura de brotes promedio en centímetros; N.R: número de raíces promedio; L.R: longitud de raíces promedio en centímetros. Entre tratamientos, letras iguales representan diferencias no significativas. F: valor del estadístico para cada variable analizada; SE: valor del error estándar agrupado. Tamaño de la muestra de E.R., N.B. y N.R.= 30, tamaño de muestra para A.B. y L.R.= 10.

De particular interés son aquellos tratamientos que estadísticamente formaron tanto el mayor número como la mayor altura de brotes correspondiendo al tratamiento T3 que genero 14.16 brotes de 1.53 cm de altura (Fig.2a), aunque los brotes del tratamiento T2 midieron hasta 1.71 cm de altura, estadísticamente se consideran iguales.

El tratamiento T5 formó el mayor número de raíces (15.16 raíces) de la mayor longitud (2.72 cm de longitud) (Fig.2b).

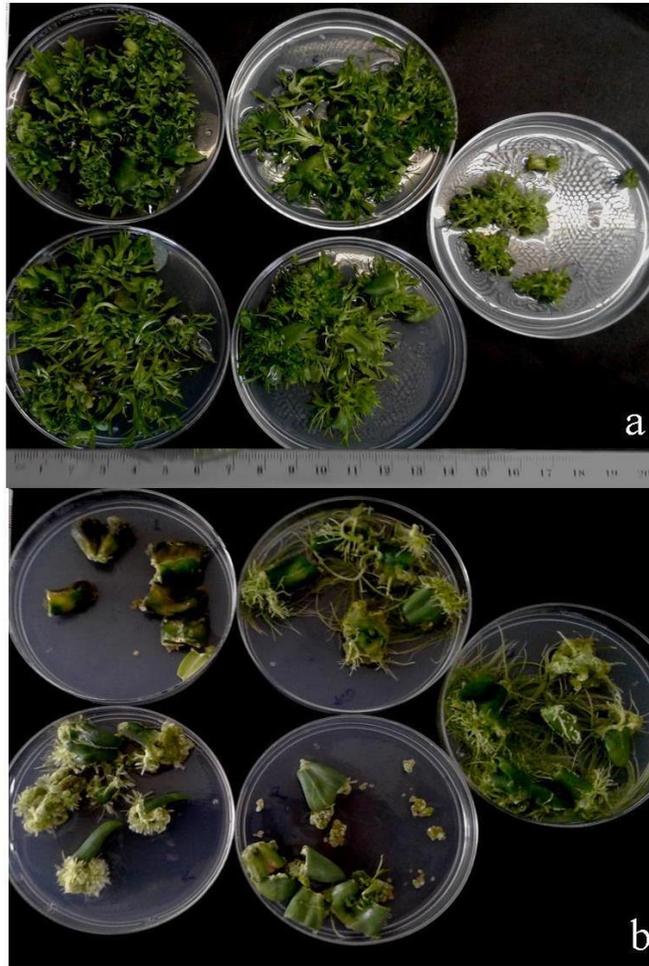


Fig. 2. Respuesta morfogénica correspondiente a los mejores tratamientos. a) tratamiento adicionado con 1.0 mg/L BA + 0.5 GA₃ (T3) considerando el mayor número de brotes formados. b) tratamiento suplementado con 0.5 mg/L NAA + GA₃ (T5) tomando en cuenta el mayor número de raíces generadas.

4. DISCUSIONES

El éxito de la regeneración de las plantas obtenidas en condición de cultivo *in vitro* depende de varios factores, entre los que se encuentra la composición del medio de cultivo especialmente del tipo de reguladores de crecimiento utilizados, ya que puede existir variación en la respuesta entre especies, cultivares e incluso entre plantas del mismo cultivar (Kaviani, 2015) por lo que las concentraciones ideales de citocinina (CK) necesitan ser establecidas para lograr tasas de multiplicación efectivas durante la proliferación de brotes; y aunque las citocininas tienen un papel más importante durante su formación, el uso de auxina NAA para inducir dicho efecto es equiparable al uso de BA (una CK; Kaviani, 2015).

Lo anterior pudo ser evaluado en el presente trabajo así como en el realizado por Kaviani *et al.*, (2014) quienes también obtuvieron los mejores resultados al utilizar medio suplementado únicamente con BA; aunque generaron brotes de mayor altura (2.07 cm) a los reportados en este ensayo empleando una menor concentración de BA (0.1 mg/L). Sin embargo, el mayor número de brotes que fueron obtenidos en el presente estudio, 14.16 brotes por explante, puede ser explicado por la mayor concentración utilizada (1.0 mg/L BA + 0.5 GA₃) en comparación con el mismo autor, quien solo generó 5.80 brotes en medio adicionado con 0.1 mg/L BA + 0.2 mg/L NAA.

El número de raíces regeneradas es comparable en ambos estudios, aun empleando diferentes concentraciones de NAA, pues ellos obtuvieron 14.53 raíces por explante utilizando solo 0.2 mg/L NAA y al aumentar la concentración (0.5 mg/L NAA + 0.5 GA₃) del mismo regulador en este trabajo se reportaron hasta 15.16 raíces.

La respuesta genotipo dependiente se pone de manifiesto si comparamos los resultados obtenidos al utilizar 0.5 mg/L BA sobre hojas de *lisianthus* cv. 'White Lavender' que generan solo 8.0 brotes por explante (Winarto *et al.*, 2015) contrastando con los 10.06 brotes formados bajo la misma concentración de reguladores utilizada en este trabajo (T2: 0.5 mg/L BA + 0.5 mg/L GA₃).

Al ser el tipo de regulador un elemento importante en la respuesta morfogénica dentro del cultivo *in vitro*, Esizad *et al.*, (2012) y Kaviani (2014) evaluaron otra citocinina (Kinetina) obteniendo resultados poco comparables a lo reportado con las concentraciones de BA del presente estudio pues dichos autores consiguieron 2.62 - 2.68 brotes por explante con 2.058- 2.15 cm de altura adicionando 1.0 mg/L KIN, a diferencia de los 14.16 brotes por explante a la misma concentración pero empleando BA (y 0.5 mg/L GA₃). Si bien es cierto, a mayor concentración de NAA (2.0 mg/L) se observó una mayor formación de callo en todos los casos citados anteriormente.

Las auxinas también inducen la síntesis de giberelinas (GA) que promueven el crecimiento del tallo estimulando la división y elongación celular (Jordan y Casaretto, 2006), siendo congruente a lo reportado por Mousavi *et al.*, (2012a, 2012b) y Akbari *et al.*, (2014) quienes con 1.0 mg/L BAP + 1.0 mg/L GA₃ obtuvieron 1.22-1.492 brotes a partir de callo con 1.11-1.560 cm de longitud considerándolo su mejor tratamiento; y en este estudio el mejor tratamiento corresponde a una concentración de 1.0 mg/L BA + 0.5 mg/L GA₃, el cual genera el mayor número de brotes aunque de manera directa.

A pesar de que la respuesta morfogénica en el cultivo *in vitro* depende directamente del genotipo y del tipo/concentración de reguladores de crecimiento empleados, por citar algunos factores, se puede concluir que al utilizar 1.0 mg/L BA + 0.5 mg/L GA₃ se generaron de manera directa el mayor número de brotes (14.16 brotes por explante), cuyo valor es superior incluso a lo reportado anteriormente por diferentes autores empleando el mismo tipo de reguladores a concentraciones similares.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT Proyecto CB 2012-01 (183591), a la Comercializadora Purépecha de Flores y Follajes S.A. de C.V. y al CIATEJ, A.C.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores del presente artículo declaramos no tener ningún tipo de conflicto de intereses, ni ninguna relación económica, personal, política, interés financiero ni académico que pueda influir en nuestro juicio. Además de no haber recibido ningún tipo de beneficio de alguna fuente que pudiera tener interés en los resultados de esta investigación.

REFERENCIAS

- Akbari H., Pajooheshgar R. & Karimi N. 2014. Evaluating the micropropagation of Lisianthus (*Eustoma grandiflora* L.) as an important ornamental plant. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*. 4(2): 596-602.
- Albor-Pinto C., Ortiz-Díaz J. J., Palma-Pech G. & Tun-Garrido J. 2016. Primer registro de *Schultesia heterophylla* (Gentianaceae) para la península de Yucatán. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 87(2): 508-511.
- Clava G. & Pérez J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*. 6(11): 1-16.
- De la Riva-Morales F., Mazuela-Águila P.C. & Urrestarazu-Gavilán M. 2013. Comportamiento productivo del lisianthus (*Eustoma grandiflorum* [Raf.] Shinn) en cultivo sin suelo. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 19(2): 141-150.
- Esizad S., Kaviani B., Tarang A. & Bohlooli S. 2012. Micropropagation of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*), an ornamental plant. *Plant Omics Journal*. 5(3): 314-319.
- Jordán M. & Casaretto J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile. pp 28.
- González D. C. 2015. Calidad y vida postcosecha de *Eustoma grandiflorum* ([Raf.] Shinn) cultivada con bacterias promotoras de crecimiento y cubierta con poli (acetato de vinilo -co- alcohol vinílico). Centro de Investigación en Química Aplicada, Saltillo, Coahuila, México. pp 70.
- Harbaugh B. 2006. Lisianthus, *Eustoma grandiflorum*. In: *Flower Breeding and Genetics*. Anderson, N. Springer, Países Bajos. pp 645-663.
- Hernández C. 2011. Respuesta de Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Raf.) CV. Echo Blue a diferentes dosis de nitrógeno, calcio y magnesio. Universidad Autónoma de Chapingo, Texcoco, Estado de México, México. pp 146.
- Kaviani B. 2014. Micropropagation of ten weeks (*Matthiola incana*) and lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) (two ornamental plants) by using kinetin (KIN), naphthalene acetic acid (NAA) and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*. 13(1): 141-154.

Kaviani B., Zamirae F., Zajani S., Tarang A. & Torkashvand A. 2014. In vitro flowering and micropropagation of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) in response to plant growth regulators (NAA and BA). *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*. 13(4): 145-155.

Kaviani B. 2015. Some useful information about micropropagation. *Journal of Ornamental Plants*. 5: 29-40.

Mousavi E. S., Behbahani M., Hadavi E. & Miri S. M. 2012a. Callus induction and plant regeneration in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). *Trakia Journal of Sciences*. 10: 22-25.

Mousavi E. S., Behbahani M., Hadavi E., Miri S. M. & Karimi N. 2012b. Plant regeneration in *Eustoma grandiflorum* from axillaries buds (Gentianaceae). *Trakia Journal of Sciences*. 10(2): 75-78.

Murashige T. & Skoog F. 1962. A Revised Medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.

Namesny A. 2005. De Lisianthus a Capsicum: mejora genética en ornamentales. *Horticultura Internacional*. 47: 34-37.

Rezaee F., Ghanati F. & Boroujeni L. Y. 2012. Micropropagation of Lisianthus (*Eustoma grandiflora* L.) from different explants to flowering onset. *Iranian Journal of Plant Physiology*. 3(1): 583 – 587.

Vidari G. & VitaFinzi P. 2010. Las Gentianaceae: botánica, fitoquímica y actividad biológica. *La Granja*. 11: 3-14.

Winarto B., Rachmawati F., Setyawati A. & Teixeira da Silva J. 2015. Leaf-derived organogenesis *in vitro* for mass propagation of lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf. Shinn)). *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 27(6): 495-501.