

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Determinación de la concentración óptima de sacarosa en combinación con citoquininas para multiplicación clonal y obtención de microbulbos de *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urb. 1918 (Iridaceae) “yawar piri piri”

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en
Biología

Bach. Amy Aracelli Guerra Cossi

Lima, Perú

2018

DEDICATORIA

A mi abuelo, quién siempre confió en mí y me enseñó que uno debe luchar por lo que quiere. Estas en mis recuerdos.

A mi tía Victoria y mi abuela, dos mujeres que son mis referentes por su calidad de persona y por su profesionalismo a carta cabal. No hay día que no las extrañe.

A mi querido Hermano Renzo, te extraño en cada momento de mi vida. Siempre estás a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos, gracias por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida y toda su paciencia.

Al Dr. Mauro Quiñones, por haberme asesorado y brindado la oportunidad de realizar la presente investigación en el Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Vegetal.

A mis amigos y colegas del laboratorio, por su apoyo y compañía durante el desarrollo de mi tesis.

A los jurados evaluadores, por sus críticas y sugerencias para pulir esta tesis.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	4
2.1. <i>Eleutherine bulbosa</i> : Clasificación taxonómica y distribución geográfica.....	4
2.2. Características morfológicas.....	5
2.3. Cultivo <i>in vitro</i> de plantas	5
2.3.1. Micropropagación <i>in vitro</i>	6
2.3.1.1 Micropropagación <i>in vitro</i> en plantas bulbosas	7
2.4. Propiedades medicinales y usos tradicionales del género <i>Eleutherine</i>	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Obtención de material biológico.....	17
3.2. Preparación de los medios de cultivo.....	17
3.2.1. Medio para introducción <i>in vitro</i> de <i>Eleutherine bulbosa</i>	17
3.2.2. Medios de cultivo de multiplicación clonal para determinar la concentración óptima de sacarosa e influencia de fitohormonas en <i>Eleutherine bulbosa</i>	18
3.3. Desinfección e introducción <i>in vitro</i> de meristemos	19
3.4. Multiplicación clonal de <i>Eleutherine bulbosa</i>	19
3.4.1. Determinación del efecto de la sacarosa en la multiplicación y formación de microbulbos de <i>Eleutherine bulbosa</i>	20
3.4.2. Determinación del efecto de la sacarosa y 6-BAP en la multiplicación y formación de microbulbos de <i>Eleutherine bulbosa</i>	20
3.4.3. Determinación del efecto de la sacarosa y Kinetina en la multiplicación y formación de microbulbos de <i>Eleutherine bulbosa</i>	21
3.5. Diseño experimental y análisis estadístico.....	22
4. RESULTADOS	23
4.1 Desinfección e introducción <i>in vitro</i> de meristemos	23
4.2 Multiplicación clonal de <i>Eleutherine bulbosa</i>	23

4.2.1. Determinación del efecto de la sacarosa en la multiplicación y formación de microbulbos de <i>Eleutherine bulbosa</i>	24
4.2.2. Determinación del efecto de la sacarosa y 6-BAP en la multiplicación y formación de microbulbos de <i>Eleutherine bulbosa</i>	27
4.2.3. Determinación del efecto de la sacarosa y Kinetina en la multiplicación y formación de microbulbos de <i>Eleutherine bulbosa</i>	30
5. DISCUSIÓN	34
5.1. Desinfección e introducción <i>in vitro</i> de meristemos	34
5.2. Multiplicación clonal de <i>Eleutherine bulbosa</i>	35
5.2.1. Determinación del efecto de la sacarosa en la multiplicación y formación de microbulbos de <i>Eleutherine bulbosa</i>	36
5.2.2. Determinación del efecto de la sacarosa y 6-BAP en la multiplicación y desarrollo de microbulbos de <i>Eleutherine bulbosa</i>	39
5.2.3. Determinación del efecto de la sacarosa y Kinetina en la multiplicación y formación de microbulbos de <i>Eleutherine bulbosa</i>	41
6. CONCLUSIONES.....	43
7. RECOMENDACIONES	45
8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	46
9. ANEXOS	53
9.1 Figuras	53
9.2 Tablas	78

FIGURAS

Figura 1. Mapa de ubicación del “Jardín botánico de plantas medicinales de Allpahuayo”. Distrito de Iquitos, provincia de Maynas, Región de Loreto.....	53
Figura 2. Bulbos de <i>Eleutherine bulbosa</i> “yawar piri piri” recolectados en del “Jardín botánico de plantas medicinales de Allpahuayo”	54
Figura 3. Proceso de esterilización de explantes de <i>E. bulbosa</i> “yawar piri piri” ...	54
Figura 4. Proceso de aislamiento de los meristemos.....	55
Figura 5. Meristemo de <i>Eleutherine bulbosa</i> “yawar piri piri”.....	55
Figura 6. Proceso de introducción <i>in vitro</i> de meristemo de <i>E. bulbosa</i>	56
Figura 7. Evaluación de microbulbos obtenidos <i>in vitro</i> de <i>E. bulbosa</i>	56
Figura 8. Plántula <i>in vitro</i> de <i>E. bulbosa</i> a los 90 días de cultivo.....	57
Figura 9. Plántulas <i>in vitro</i> de <i>E. bulbosa</i> a los 120 días de cultivo.....	57
Figura 10. Multiplicación clonal de <i>E. bulbosa</i> “yawar piri piri” <i>in vitro</i>	58
Figura 11. Plántulas <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de sacarosa (30, 60, 90, 120 y 150 g/L) a los 30, 60 y 90 días de cultivo.	59
Figura 12. Plántulas <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de sacarosa (30, 60, 90, 120 y 150 g/L) a los 120, 150 y 180 días de cultivo.	60
Figura 13. Influencia de sacarosa en la formación del número de microbulbos a los 30 días	61
Figura 14. Influencia de sacarosa en la formación del número de microbulbos a los 60 días	61
Figura 15. Influencia de sacarosa en la formación del número de microbulbos a los 90 días.	62
Figura 16. Influencia de sacarosa en la formación del número de microbulbos a los 120 días.....	62
Figura 17. Influencia de sacarosa en la formación del número de microbulbos a los 150 días.....	63
Figura 18. Influencia de sacarosa en la formación del número de microbulbos a los 180 días.....	63
Figura 19. Influencia de sacarosa en el diámetro de microbulbos a los 180 días.	64

Figura 21. Plántulas <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de sacarosa (30, 60, 90, 120 y 150 g/L) y 6-BAP a los 120, 150 y 180 días de cultivo.	66
Figura 22. Influencia de la sacarosa y 6-BAP en la formación del número de microbulbos a los 30 días.....	67
Figura 23. Influencia de la sacarosa y 6-BAP en la formación del número de microbulbos a los 60 días.....	67
Figura 24. Influencia de la sacarosa y 6-BAP en la formación del número de microbulbos a los 90 días.....	68
Figura 25. Influencia de la sacarosa y 6-BAP en la formación del número de microbulbos a los 120 días.....	68
Figura 26. Influencia de la sacarosa y 6-BAP en la formación del número de microbulbos a los 150 días.....	69
Figura 27. Influencia de la sacarosa y 6-BAP en la formación del número de microbulbos a los 180 días.....	69
Figura 28. Influencia de la sacarosa y 6-BAP en el diámetro de los microbulbos a los 30 días.....	70
Figura 29. Plántulas <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de sacarosa (30, 60, 90, 120 y 150 g/L) y Kinetina a los 30, 60 y 90 días de cultivo.....	71
Figura 30. Plántulas <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de sacarosa (30, 60, 90, 120 y 150 g/L) y Kinetina a los 120, 150 y 180 días de cultivo.....	72
Figura 31. Influencia de la sacarosa y Kinetina en la formación del número de microbulbos a los 30 días.....	73
Figura 32. Influencia de la sacarosa y Kinetina en la formación del número de microbulbos a los 60 días.....	73
Figura 33. Influencia de la sacarosa y Kinetina en la formación del número de microbulbos a los 90 días.....	74
Figura 34. Influencia de la sacarosa y Kinetina en la formación del número de microbulbos a los 120 días.....	74
Figura 35. Influencia de la sacarosa y Kinetina en la formación del número de microbulbos a los 150 días.....	75

Figura 36. Influencia de la sacarosa y Kinetina en la formación del número de microbulbos a los 180 días.....	75
Figura 37. Influencia de la sacarosa y Kinetina en el diámetro de los microbulbos a los 180 días.	76
Figura 38. Influencia de la sacarosa, Kinetina y 6-BAP en la formación de microbulbos.	77

TABLAS

Tabla 1. Composición del medio Murashige-Skoog (1962).....	78
Tabla 2. Tratamientos utilizados en la multiplicación clonal de <i>Eleutherine bulbosa</i>	79
Tabla 3. Promedio de número de microbulbos y error estándar por tratamiento de sacarosa.....	80
Tabla 4. Promedio de número de microbulbos y error estándar por tratamiento de sacarosa en combinación con 6-BAP.....	81
Tabla 5. Promedio de número de microbulbos y error estándar por tratamiento de sacarosa en combinación con Kinetina.	82
Tabla 6. Promedio del diámetro de microbulbos y error estándar por tratamiento a los 180 días de cultivo.....	83

RESUMEN

Eleutherine bulbosa (Miller) Urb. 1918, “yawar piri piri”, es una especie utilizada como planta medicinal por las comunidades nativas en las regiones de Loreto, Huánuco y Ucayali. En la presente investigación se determinó la concentración óptima de sacarosa en combinación con citoquininas para la multiplicación clonal y obtención de microbulbos. Durante la etapa de desinfección se utilizó NaOCl al 2.5% durante 15 min, lo que permitió obtener un 83.3% de explantes no contaminados. Mientras que, en la etapa de multiplicación se evaluó 15 tratamientos con medio MS y suplementados con: 30, 60, 90, 120 y 150 g/L de sacarosa, los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5; los tratamientos T6, T7, T8, T9, T10 con 1mg/L de 6-BAP y 30, 60, 90, 120 y 150 g/L de sacarosa; y los tratamientos T11, T12, T13, T14, T15, fueron suplementados con 1mg/L de Kinetina y 30, 60, 90, 120 y 150 g/L de sacarosa, respectivamente. En el medio MS suplementado con 60g/L de sacarosa y 1mg/L de Kinetina se logró obtener microbulbos de forma ovalada y color rojizo violáceo, similares o idénticos a los de la planta madre. Sin embargo, en el medio MS suplementado con 120g/L de sacarosa, se obtuvo el mayor promedio con 9.58 ± 1.49 microbulbos/explante con 3.47 ± 0.08 mm de diámetro, mientras que en el tratamiento suplementado con 150g/L de sacarosa no se observó la proliferación de microbulbos. Además, en el medio MS suplementado con 30g/L de sacarosa y 1mg/L de 6-BAP se logró obtener microbulbos de forma alargada y color blanco y, en los medios de cultivos enriquecidos con 90, 120 y 150g/L de sacarosa y 1mg/L de 6-BAP, se logró obtener microbulbos de forma cónica redondeada y de color rojizo violáceo, respectivamente.

Palabras clave: *Eleutherine bulbosa*, multiplicación clonal, 6-BAP (Bencilaminopurina), Kinetina, Murashige-Skoog (MS), *in vitro*.

ABSTRACT

Eleutherine bulbous (Miller) Urb. 1918, "yawar piri piri", is a species used as a medicinal plant by the native communities in the Loreto, Huánuco and Ucayali regions. In the present investigation, the optimal concentration of sucrose in combination with cytokinins was determined for clonal multiplication and obtaining microbulbs. During the disinfection stage, 2.5% NaOCl was used for 15 min, which allowed obtaining 83.3% of non-contaminated explants. While, in the multiplication stage 15 treatments were evaluated: treatment 1 (T1), 2 (T2), 3 (T3), 4 (T4), 5 (T5), MS media supplemented with 30, 60, 90, 120 and 150 g / L of sucrose; treatment 6 (T6), 7 (T7), 8 (T8), 9 (T9), 10 (T10), MS medium supplemented with 1mg / L of 6-BAP and 30, 60, 90, 120 and 150 g / L of sucrose; treatment 11 (T11), 12 (T12), 13 (T13), 14 (T14), 15 (T15), MS medium supplemented with 1mg / L of Kinetin and 30, 60, 90, 120 and 150g / L of sucrose , respectively. In the MS medium supplemented with 60g / L of sucrose and 1mg / L of Kinetin, it was possible to obtain oval-shaped and reddish violet-colored microbes, similar or identical to those of the mother plant. However, in the MS medium supplemented with 120g / L of sucrose, the highest average was obtained with 9.58 ± 1.49 microbulbs / explant with 3.47 ± 0.08 mm in diameter, while in the treatment supplemented with 150g / L of sucrose was not observed the proliferation of microbulbs. In addition, in MS medium supplemented with 30g / L of sucrose and 1mg / L of 6-BAP it was possible to obtain microbulbs of elongated shape and white color, and in culture media enriched with 90, 120 and 150g / L of sucrose and 1mg / L of 6-BAP, it was possible to obtain microbulbs with a rounded conical shape and a purplish reddish color, respectively.

Key words: *Eleutherine bulbosa*, Clonal Multiplication, 6-BAP (Benzylaminopurine), Kinetin, Murashige-Skoog (MS), in vitro.

1. INTRODUCCIÓN

Eleutherine bulbosa (Miller) Urb. 1918, conocida como “yawar piri piri”, es una especie distribuida en el continente americano; en el Perú crece en suelos húmedos con abundante materia orgánica en las regiones de Loreto (106 m.s.n.m), Huánuco (647 m.s.n.m) y Ucayali (154 m.s.n.m), y es ampliamente conocida por las comunidades nativas como planta medicinal. Estudios bioquímicos realizados en Haití, Brasil y Sudeste Asiático en el género *Eleutherine*, revelan que contiene naftoquinonas (piranonaftoquinonas) y esteroides, compuestos con propiedades antitumorales y anticonceptivas, sin embargo, en el Perú ha sido poco estudiada. En la medicina ancestral, los bulbos de *E. bulbosa* son utilizados como anticonceptivo y regulador de la fertilidad, en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, control de hemorragias post parto, tratamiento de parásitos intestinales y cólicos estomacales.

En la actualidad hay una creciente demanda de plantas medicinales. La mayoría de las plantas comercializadas en el mundo son extraídas indiscriminadamente de su hábitat natural, causando la sobre explotación de los recursos y poniendo en riesgo de extinción a diversas especies. La Biotecnología es una alternativa sustentable a las prácticas tradicionales. Por ejemplo: las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* permiten: la micropropagación clonal de plantas medicinales de gran valor económico para la producción de metabolitos secundarios de uso farmacológico, la conservación de especies vegetales en peligro de extinción, y producir plantas uniformes a escala comercial a partir de un genotipo selecto en menor tiempo y con una tasa de multiplicación ilimitada.

El objetivo de esta investigación fue determinar la concentración óptima de sacarosa en combinación con citoquininas para la multiplicación clonal y obtención de microbulbos de *Eleutherine bulbosa* “yawar piri piri”, lo cual permitirá un aprovechamiento sostenido de esta especie en nuestro país.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Eleutherine bulbosa*: Clasificación taxonómica y distribución geográfica

La especie *Eleutherine bulbosa* “yawar piri piri” se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera:

Reino: Plantae

Clase: Liliopsida

Subclase: Liliidae

Orden: Asparagales

Familia: Iridaceae

Género: *Eleutherine*

Especie: *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urban, 1918

Se tiene registro de la especie *Eleutherine bulbosa* en forma natural en: Argentina, Bolivia, Brasil, Ecuador, El Salvador, Guyana Francesa, Guatemala, México, Honduras, Estados Unidos, Venezuela, Haití, Perú: en las regiones de Loreto (Iquitos, Yurimaguas, Contamana), Ucayali (Pucallpa), Huánuco (Tingo María) y Trinidad y Tobago (Weniger, 1982, Pinedo *et al.*, 1997; Mejía & Rengifo, 2000 y Lans, 2007).

La familia Iridaceae comprende aproximadamente 2050 especies distribuidas en 67 géneros, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el Sur de África. (Goldblatt *et al.*, 2008). Los Neotrópicos (incluye a toda América del Sur, Centroamérica y Antillas) son considerados el segundo centro más importante de la diversidad de esta familia, con la presencia de 250 especies conocidas y 30 géneros. (Judd *et al.*, 2008; Forzza *et al.*, 2010).

2.2. Características morfológicas

Eleutherine bulbosa es una planta herbácea que mide aproximadamente 50 cm de altura. Presenta hojas alargadas, ensiformes y verticiladas que miden aproximadamente 40 cm de largo y 2,5 cm de ancho, y poseen de 6 a 7 nervaduras longitudinales. Las flores son de color blanco con 5 a 6 pétalos soldados en la base. Esta especie se caracteriza por tener bulbos de color rojizo violáceo de 4 cm de largo por 2,5 cm de ancho, conformados por envolturas que dan origen a las hojas. (Pinedo *et al.*, 1997; Mejía & Rengifo, 2000).

2.3. Cultivo *in vitro* de plantas

Los primeros trabajos en cultivo *in vitro* tuvieron como objetivo la formación de una masa de células parenquimatosas (callo) a partir de los explantes (tejidos), de tabaco y zanahoria, lo que significó el despegue de las técnicas de cultivo *in vitro*. (White, 1939; Nobecourt, 1940)

Se define cultivo *in vitro* de plantas superiores como: el cultivo en medio nutritivo de plantas, semillas, embriones, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores en condiciones estériles. El término cultivo *in vitro* es genérico y se refiere a la metodología usada, más que al propio objetivo de ese método. En sentido, estricto, *in vitro* quiere decir “dentro de vidrio”, es decir, el cultivo de plantas o de alguna de sus partes dentro de recipientes de vidrio en condiciones de ambiente controlado. (Pierk, 1991)

El cultivo de tejidos puede utilizarse para diversos propósitos como son: la micropropagación, la obtención de plantas libres de virus y otros patógenos, el mejoramiento genético y la conservación en banco de germoplasma. (Abdelnour & Escalant, 1994)

Un factor importante en el desarrollo de las técnicas de cultivo vegetales fue el descubrimiento de los reguladores de crecimiento.

El mantenimiento de los recursos fitogenéticos mediante los métodos del cultivo *in vitro* se logra modificando las condiciones del cultivo, entre ellas: composición del medio de cultivo, con la disminución y/o modificación de la cantidad del contenido mineral (Rayas *et al.*, 2002), la adición de agentes osmóticos y/o la incorporación de retardantes de crecimiento (Espinosa *et-al*, 2002), la iluminación, temperatura, entre otras. Estas modificaciones influyen sobre la velocidad de la división celular, el crecimiento normal y el metabolismo, reduciendo la frecuencia de transferencia de las plantas a un medio de cultivo fresco (García-Águila *et-al*, 2007), con la finalidad de reducir en lo posible el elevado número de variables que implica estas transferencias de cultivo *in vitro* como: riesgos de alteración genética, costos en tiempo, pérdida por accidente o contaminación de los explantes por la manipulación, entre otras (Pérez *et al.*, 2010).

2.3.1. Micropropagación *in vitro*

La micropropagación se definió como “cualquier” procedimiento aséptico que requiere la manipulación en las plantas, de órganos, tejido o células que van a producir una determinada población de plantas (Krikorian, 1991).

La obtención de plántulas *in vitro* se logra a través de tres vías diferentes: (I) A partir de brotes, primordios, meristemo y embriones presentes en el explante a utilizar. (II) A partir de un brote o meristemo iniciado dentro de un callo o directamente sobre el explante. (III) A partir de un embrión somático. (Abdelnour & Escalant, 1994)

Las ventajas de la micropropagación son:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo en espacios reducidos: Cuando se usan métodos de propagación convencionales un esqueje produce una planta y una semilla, sin embargo, un explante puede producir un infinito número de plantas.
- Evita el riesgo de contaminación con patógenos, ya que se realiza en condiciones controladas.

- Permite controlar las condiciones ambientales, debido a su independencia de los mismos (luz, temperatura y humedad controlada).
- Facilita el transporte del material
- Propagación masiva de plántulas, especialmente especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción.
- Obtención de plantas libres de virus.
- Producción de semillas sintéticas.
- Conservación en banco de germoplasma
- Germinación de semillas
- Estudios fisiológicos diversos
- Producción de haploides. (Abdelnour & Escalant, 1994; Segretín, 2006)

La micropropagación presenta cuatro etapas principales: 1) establecimiento del cultivo, 2) desarrollo y multiplicación de vástagos o embriones, 3) enraizamiento y 4) aclimatación de las plántulas. Generalmente, las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones *ex vitro*. (Levitus *et al.*, 2010). Algunos autores consideran que existe una etapa 0 (objetivo la elección y preparación del explante).

2.3.1.1 Micropropagación *in vitro* en plantas bulbosas

a) Desinfección e introducción *in vitro*

Rice *et al.* (1983) usaron NaOCl al 2% durante 10 minutos para desinfectar bulbos de *Tulipa "Merry Widow"*. Además, estudiaron la producción de bulbos en un medio basal MS suplementado con 30, 40, 50, 60, 70 y 80g/L de sacarosa, determinando que la concentración óptima fue 60g/L de sacarosa, donde se logró 2.14 bulbos/explante.

Nagukubo *et al.*, 1993 reportaron el uso de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2% durante 10 minutos para desinfectar bulbos de *Allium sativum L.*, a continuación, estos fueron sembrados en medio LS suplementado con una concentración entre

60g/L a 120g/L de sacarosa, la cual indujo el proceso de bulbificación *in vitro* en esta especie.

El uso de la solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 2% al 5% es lo más recomendado en el cultivo de tejidos vegetales, ya que inhibe de forma irreversible, la actividad enzimática indispensable para el metabolismo celular en los microorganismos, así como la integridad de su membrana citoplasmática. (Abdelnour- Esquivel y Escalant 1994; Estrela *et al.*, 2002)

Kumar y Nayak (2005) utilizaron cloruro de mercurio al 0.1% por 30 minutos para la desinfección de los bulbos de *Ornithogalum virens*, además para la formación de bulbos *in vitro*, los explantes fueron sembrados en un medio MS suplementado con ANA (0.5, 1, y 2 mg/L), 6-BAP (0.5, 1 y 2 mg/L) y sacarosa (45-90g/L). Siendo el tratamiento más efectivo el medio MS enriquecido con ANA (1mg/L), 6-BAP (2mg/L) y 60g/L de sacarosa, donde se obtuvo entre 12-15 bulbos con un tamaño de 2-10mm en 5 semanas de cultivo.

Sultana *et al.* (2010) utilizaron una solución Clorox, con una concentración de 10-12% de NaOCl por 10 minutos para la producción *in vitro* de bulbos de *Hippeastrum hybridum*. Asimismo, evaluaron el efecto de un medio MS suplementado con diferentes concentraciones de BAP (0, 2, 4, 6 y 8 mg/L), CCC (0, 125, 250 y 500 mg/L) y sacarosa (30, 60, 80, 90 y 110 g/L). La mayor formación de bulbos se observó en un medio suplementado con 6mg/L BAP, 500mg/L CCC y 90 g/L de sacarosa.

Ascough y Van Staden (2010) desinfectaron los bulbos de *Albuca bracteata* con la inmersión de los explantes, en primer lugar, en una solución de NaOCl al 3.5% por 10 minutos y a continuación en una solución de cloruro de mercurio al 0.1% durante 10 minutos. Asimismo, demostraron que una concentración menor o igual a 30g/L de sacarosa induce la formación de bulbos en esta especie, mientras que una cantidad mayor a 30g/L de sacarosa inhibe el desarrollo de bulbos.

Hoesen (2010) realizó la introducción *in vitro* de la especie *Eleutherine sp.* (Iridaceae), para esto desinfectó los explantes (microbulbos con 0.3 - 0.5 cm de

diámetro) con una solución de hipoclorito de sodio (Clorox al 30 – 40%) con un tiempo de exposición de 20 minutos. Como medio de iniciación utilizó un medio MS suplementado con 1mg/L de 6-BAP. Luego, en la etapa de multiplicación analizó dos medios de cultivo: MS suplementado con 2mg/L de 6-BAP y 5mg/L de 6-BAP.

Paredes *et al.* (2014) emplearon NaOCl al 2.5% en combinación con 2 gotas de Quix durante 15 minutos para la desinfección de los bulbos de *Traubia modesta*. En la fase de multiplicación se utilizó: (1) medio MS sin reguladores de crecimiento, (2) MS suplementado con 3mg/L de 6-BAP y 0.5mg/L de ANA, (3) MS suplementado con 2mg/L de 6-BAP y 1mg/L de ANA y (4) MS suplementado con 6-BAP y 2mg/L de ANA. Se obtuvo 28 bulbos *in vitro* por planta madre, con un rango de multiplicación de 1.3 a 2.2. No hubo una diferencia significativa entre los cuatro tratamientos.

b) Influencia de sacarosa en cultivo *in vitro* de plantas bulbosas

Heath y Hollies (1963) mencionaron que el diámetro basal de los bulbos aumenta conforme sea mayor la concentración de azúcar en el medio, ya que son fácilmente asimilados por las plantas de *Allium cepa L.*

Kato (1965), reportó que altas concentraciones de sacarosa, ocasionan que el tejido basal de *Allium cepa* funcione como sumidero y desarrolle bulbos más vigorosos.

La bulbificación se considera como la acumulación de carbohidratos (Lercari., 1982), lo cual es fácilmente observable a través de la hinchazón basal de las vainas más externas de la planta.

Thorpe (1985) menciona que la importancia del balance entre carbono y energía en el medio ha sido investigada durante mucho tiempo. Estos estudios llevaron a la conclusión de que la sacarosa era la mejor fuente de carbono, aunque dependerá de la especie. La capacidad de utilizar diversas fuentes de carbono para el crecimiento *in vitro* indica que estos productos son absorbidos en las

células y se integran al metabolismo celular. Es por ello que concluyó que la concentración de sacarosa en medio de cultivo puede provocar grandes efectos en la morfogénesis y crecimiento de las plantas.

Sakuta *et al.* (1987) investigaron el efecto de 2 concentraciones de sacarosa (30g/L y 60g/L) en la producción de betaciatina a partir de células de *Phytolacca americana*. Ellos observaron que, la acumulación de este metabolito en un medio de cultivo suplementado con 30g/L de sacarosa fue óptima, concluyendo que el incremento de la concentración de sacarosa puede reducir el tamaño y número de células.

Cormier *et al.* (1989) investigaron los efectos de la concentración de sacarosa sobre la acumulación de antocianinas en *Vitis vinifera*. Utilizaron 4 concentraciones de sacarosa (20g/L, 30g/L, 50g/L y 60g/L de sacarosa). En los tratamientos suplementados con 20g/L y 30 g/L de sacarosa no se observó un cambio significativo, sin embargo en el medio suplementado con 50g/L de sacarosa determinaron la mayor cantidad de antocianinas. Con estos resultados demostraron que el estrés provocado por altas concentraciones de sacarosa en medio de cultivo desencadena la acumulación de antocianinas en las células.

La sacarosa en concentraciones entre 2 al 4 %, constituye la fuente de carbono más utilizada en los medios de cultivo ya que es sintetizada, transportada y metabolizada de manera natural en las plantas (Pierik, 1991), además estimula la formación de órganos de reserva en plantas bulbosas (Chow *et al.*, 1992; Gerrits & Klerk., 1992).

Kahane *et al.* (1992) reportaron que la formación de microbulbos en *Allium cepa L.* depende principalmente de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, estas diferencias se observaron a partir de los 60 días de cultivo. Utilizaron tratamientos enriquecidos con 40g/L, 60g/L, 80g/L, 100g/L y 120g/L de sacarosa, siendo este último el más efectivo.

Keller (1993) indujo a la formación de microbulbos en *Allium sp.* y *Allium ampeloprasum var. Porrum* utilizando tres concentraciones de sacarosa (30, 50,

150 g/L) en combinación con la benciladenina (BA: 0, 12.5 mg/L) o etileno durante (0, 5, 20 días). El mayor porcentaje de obtención de microbulbos se observó en los tratamientos con las diferentes concentraciones de sacarosa con etileno.

Macia (1994) evaluó las condiciones mínimas de crecimiento con la utilización de agentes osmóticos en yuca (*Manihot esculenta Crantz*). En el primer ensayo, utilizó 5 concentraciones diferentes de sacarosa (0, 10, 20, 40 y 80g/L) en el medio MS + 1 mg/L de tiamina, 100 mg/L inositol + 0,01 mg/L ácido naftalenacético (NAA), 0,02 mg/L bencilaminopurina (BAP) + 0,1 mg/L de ácido giberélico (AG3) Los mejores resultados se obtuvieron con las concentraciones de 10 y 20 g/L de sacarosa. En el segundo ensayo utilizó dos concentraciones de sacarosa (0 a 20g/L) y tres de manitol o sorbitol (0, 5 y 10 g/L). La ausencia de la sacarosa en el medio de cultivo afectó considerablemente el crecimiento de las plantas, mientras que, el manitol tuvo un mayor efecto positivo que el sorbitol sobre el desarrollo de las plantas. La concentración de 10g/L de ambos azúcares inhibe el crecimiento de manera crítica. Los mejores resultados se obtuvieron con 20g/L de sacarosa sin manitol ni sorbitol.

Mohamed-Yassen *et al.* (1995) reportaron la formación de bulbos de *Allium spp.* en un medio M&S suplementado con 120g/L de sacarosa y 5g/L de carbón activado. El agregar este último componente incrementaba la temperatura y estimulaba la formación de bulbos.

Jiménez (1995) reportó que elevadas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo promueven un crecimiento vigoroso de las raíces

Descendit & Mérillon (1996) reportaron la producción de antocianinas en cultivo en suspensión de *Vitis vinífera* enriqueciendo el medio de cultivo con 4 concentraciones de sacarosa: 20, 45, 60 y 80 g/L de sacarosa durante 18 días. Reportaron la máxima concentración de antocianinas entre los días 12 y 14 en el medio suplementado con 60g/L de sacarosa, concluyendo que la mayor cantidad de antocianinas está fuertemente asociada a altas concentraciones de sacarosa. Esto coincide con lo reportado por Kim & Kim (2002) quien evaluó los efectos de

nitrógeno y azúcar en el medio de cultivo para la producción de antocianinas, concluyendo que la sacarosa al ser rápidamente hidrolizada a fructuosa y a glucosa incrementa la producción de este metabolito. Obtuvieron la mayor concentración de antocianinas en 40g/L de sacarosa luego de 12 días de cultivo.

Kumar *et al.* (1999) micropropagaron tres cultivares de *Gladiolus hybridus* a partir de segmentos de cormo sembrados en medio MS. Observaron que en el medio suplementado con 120g/L de sacarosa hubo un aumento significativo de brotes. (18 brotes/explante).

Benkeblia (2003) investigaron la producción de CO₂, azúcares y compuestos fenólicos en *Allium cepa*. Identificaron que los compuestos fenólicos interfieren indirectamente con el proceso de brotación.

Miñano *et al* (2004) evaluaron el efecto de la concentración de sacarosa en la producción de antocianinas a partir de cultivos celulares de *Vitis vinifera L. var. red globe*. Se suplemento el medio de cultivo basal con concentraciones de 0, 20, 45 y 60g/L de sacarosa; determinaron que la producción de antocianinas aumenta a medida que se incrementa la concentración de azúcar, si bien se crea un estrés osmótico que inhibe el crecimiento celular, esto mejora la acumulación de antocianinas.

Quero (2004), estudió el proceso de rizogénesis en *Ananas comosus L. Mrr.* y concluyó que elevadas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo promueven un crecimiento de las raíces

Alvarenga - Venutolo *et al.* (2007) evaluaron el efecto de la concentración de sacarosa, la temperatura, el ácido acetilsalicílico (ASA) y la combinación de algunos de estos factores Determinaron la supervivencia de los brotes después de la adición de altas concentraciones de sacarosa (0, 30, 50, 60, 70 y 80 g/l) y ácido acetilsalicílico (10⁻⁹, 10⁻⁶ y 10⁻³ M) al medio de cultivo, con disminuciones en la temperatura de crecimiento (16, 18, 20, 22 y 25°C). Consideraron que el mejor tratamiento fue la adición de 60 g/l de sacarosa al medio de cultivo con una temperatura de 16°C.

Borges *et al.* (2008) estudiaron los efectos de distintas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo en la micropropagación de embriones cigóticos de *cocos nuciferas L.* Se utilizó medio Eeuwens con la adición de sacarosa al 20, 40, 60 y 80 g/L. A los 18 meses de cultivo, determinaron que la incorporación de 60g/L de sacarosa en el medio Eeuwens fue la más adecuada para su conservación, donde se observó los más altos porcentajes de supervivencia y mayor vigor de las plántulas.

Chávez *et al.* (2010) evaluaron la influencia de la sacarosa en la multiplicación *in vitro* de *Pinus caribaea var. caribaea*. Utilizaron concentraciones de 30, 40, 50 y 60 g/L de sacarosa, en este último tratamiento se obtuvieron plantas más desarrolladas, concluyendo que el aumentar la concentración de sacarosa promueve la brotación, ya que incrementa la cantidad de carbohidratos que se pueden almacenar.

Vega *et al.* (2015) estandarizaron un protocolo para la regeneración *in vitro* de *Allium cepa var. aggregatum* a partir de meristemos apicales. En el medio de cultivo que contenía 50g/L de sacarosa, se logró un 68% de crecimiento de las plantas, mientras que en los medios suplementados con 70g/L y 90g/L de sacarosa, se obtuvo menos del 35% de plantas. Concluyeron que un excedente de sacarosa puede causar estrés osmótico, y que las plantas pueden absorber y asimilar una cantidad limitada de sacarosa.

c) Influencia de fitohormonas en cultivo *in vitro* de plantas bulbosas

El medio basal propuesto por Murashigue y Skoog (1962) ha sido utilizado frecuentemente en la mayoría de especies micropropagadas *in vitro* (Karthá, 1981). En algunos casos es necesario el uso de dos grupos de fitorreguladores de crecimiento, auxinas y citoquininas (Thorpe, 1981).

Dunstan & Short (1977) reportaron un mejoramiento en el cultivo *in vitro* de *Allium cepa* suplementando el medio de cultivo B5 con fitohormonas, asimismo Hussey (1978) concluyeron que el enriquecer el medio de cultivo con 6-BAP y 2 iP

isopentilamina, indujeron el desarrollo de plántulas más vigorosas en 8 semanas de cultivo.

El éxito de la bulbificación dependerá de la concentración de fitohormonas y de sacarosa, entre otros (Mohamed - Yasseen *et al.*, 1995), esto implica la transferencia a numerosos medios de cultivo con diferentes combinaciones de los reguladores de crecimiento y concentraciones de carbohidratos+. (Zel *et al.*, 1997).

Medina *et al* (2004) implementaron un método para la propagación clonal de seis variedades de *Oryza sativa*. Luego de cuatro semanas de cultivo, se obtuvo la mayor cantidad de brotes en un medio de cultivo suplementado con 5mg/L de 6-BAP.

Mujica & Mogollón (2004) Reportaron el efecto que tienen 3 diferentes concentraciones de sacarosa (30g/L, 60g/L y 90g/L) sobre la bulbificación *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.), asimismo estos autores en un intento de mejorar la eficiencia en la bulbificación de esta especie evaluaron el efecto de la benciladenina (6-BAP), zeatina (Z) y 2- isopentilamina (0.5; 1 y 2 mg/L), en combinación con las 3 concentraciones mencionadas anteriormente en un medio MS. Mientras que en este mismo año, García y colaboradores obtuvieron una respuesta negativa a la tuberización de *Dioscorea alata* L. variedad *Cartagena* en presencia de un medio de cultivo suplementado con 0.5mg/L de 6-BAP.

Jordan & Casaretto (2006) mencionaron que las citoquininas (6-BAP, Kin, entre otras) promueven la formación de brotes ya que causan una disminución de la dominancia apical, fomentando el crecimiento de las yemas axilares. Este tipo de fitohormonas son claves para inducir el desarrollo de *novo* brotes en diversos explantes.

Castro & Londoño (2008) evaluaron el efecto sobre la proliferación de microbulbos en el Lirio (*Lilium sp*) de tres concentraciones de Kin (0; 1; 3; 5 mg/L) en combinación con tres concentraciones de sacarosa (30, 60, 90 g/L), siendo el

mejor tratamiento el de 1mg/L de kinetina y 60g/L de sacarosa. Utilizaron medio de cultivo MS.

Gómez-Zeledón *et al.* (2011) determinaron que la incorporación de citoquininas en el medio del cultivo incrementa la síntesis de antocianinas en *Daucus carota*, mientras que Mori *et al* (2014) reportó este comportamiento en *Fragaria ananassa cv Shikinari*.

Además, Martínez *et al* (2012) lograron la formación de yemas en *Sorghum bicolor* utilizando un medio MS suplementado con una concentración de 0.10 y 0.21 mg/L de Kin, mientras que, Ascough *et al.* (2009) mencionaron que el uso de altas concentraciones de sacarosa (6-38%), citoquininas (Kinetina), así como factores de fotoperiodo y temperatura promueven la formación de microbulbos.

2.4. Propiedades medicinales y usos tradicionales del género *Eleutherine*.

En la medicina tradicional, los bulbos de *E. bulbosa* son utilizados como *vermífugo*, antibacteriano, analgésico (Hodge & Taylor., 1956), abortivo y anticonceptivo (Weniger *et al.*, 1982).

En la comunidad indígena Shipibo – Conibo, *Eleutherine bulbosa* es utilizada para el control de la natalidad (Shultes y Raffaud, 1990). Para ello se elabora el siguiente brebaje: Se realiza una decocción de 5 bulbos en 1L de agua, se concentra hasta obtener un volumen de 250mL. Esta preparación se ingerirá durante los días de la menstruación por espacio de tres periodos (meses).

En la comunidad de los maká (Paraguay), los bulbos son utilizados como tintes, del cual se obtiene una coloración roja. Para su preparación los bulbos son hervidos en agua junto con los hilos y a continuación agregan hámago de la miel de una abeja nativa, cuya finalidad es fijar el color en la tela.

En el mercado de Belén, ubicado en la ciudad de Iquitos, región Loreto, los expendedores de las plantas medicinales recomiendan el uso de los bulbos de *E. bulbosa* como antidisentérico y mencionan que es el tratamiento más efectivo para la amebiasis.

En países como Indonesia, los bulbos de *Eleutherine palmifolia* son utilizados de forma tradicional para el tratamiento del cáncer (Shibuya *et al.*, 1997). Cabe mencionar que los bulbos de *E. americana* son empleados comúnmente en la comida Tailandesa (Ifesan *et al.*, 2009).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de material biológico

Los bulbos de *Eleutherine bulbosa* “yawar piri piri”, fueron obtenidos del “Jardín botánico de plantas medicinales de Allpahuayo”, ubicado en el distrito de Iquitos (120 msnm), provincia de Maynas, región Loreto (Figura 1). Estos fueron almacenados en un cooler dentro de bolsas ziploc herméticamente selladas (Figura 2), para su traslado al Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, distrito de Surco, Lima. Donde fueron conservados a temperatura ambiente hasta su utilización.

3.2. Preparación de los medios de cultivo

En este ensayo se utilizó medio MS (Murashige-Skoog, 1962) (Tabla 1). Para su elaboración fue necesario preparar las soluciones stock de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y de quelato de hierro (Fe-EDTA). Estas se mantuvieron en frascos de vidrio debidamente rotulados y refrigerados a 4°C, hasta su uso en la preparación del medio de introducción *in vitro* y multiplicación clonal para determinar la concentración óptima de sacarosa e influencia de fitohormonas en *Eleutherine bulbosa*.

3.2.1. Medio para introducción *in vitro* de *Eleutherine bulbosa*

El medio de cultivo para introducción *in vitro* consistió en sales MS (Murashige-Skoog, 1962) (Tabla 1), y fue preparado a partir de soluciones stock de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y de quelato de hierro (Fe-EDTA). Se suplementó con 30 g/L de sacarosa y el pH se ajustó a 5.8 utilizando NaOH 1M y HCl 1M (Tabla 2). A continuación, se adicionó 3g/L del agente gelificante (Gelrite), el cual fue diluido en microondas. Luego se sirvió 10ml del medio en tubos de

ensayo de 25mm x 150mm, los cuales fueron sellados con papel aluminio y esterilizados en autoclave a 121 °C por 15 min a 1 atm de presión.

3.2.2. Medios de cultivo de multiplicación clonal para determinar la concentración óptima de sacarosa e influencia de fitohormonas en

Eleutherine bulbosa

Los medios de cultivo para determinar la concentración óptima de sacarosa e influencia de fitohormonas en la multiplicación clonal, consistieron en sales MS (Murashige-Skoog, 1962) (Tabla 2), y fueron preparados a partir de soluciones stock. Estos fueron suplementados con 1mg/L de 6-BAP ó 1mg/L de kinetina y diferentes concentraciones de sacarosa en un rango de 30g/L-150g/L, según tratamiento (Tabla 3), y el pH se mantuvo en 5.8. A continuación, se adicionó 3g/L de Gelrite, el cual fue diluido en microondas. Luego se sirvió 10mL del medio en tubos de ensayo de 25mm x 150mm y 30mL del medio en frascos de vidrio de 70mm x 120mm, los cuales fueron sellados con papel aluminio y esterilizados con autoclave en las mismas condiciones que el medio para introducción *in vitro*.

3.3. Desinfección e introducción *in vitro* de meristemos

Se seleccionaron 15 bulbos de buena apariencia sin daños en las capas externas y de coloración rojizo violáceo. Estos fueron lavados con abundante agua y detergente durante 15 minutos, luego se enjuagaron de 3 a 4 veces con agua destilada. Terminado este proceso, dentro de la cámara de flujo laminar (previamente esterilizada mediante lámpara UV por 15 minutos), los bulbos fueron sumergidos en alcohol 96° por 1 minuto y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.5% por un tiempo de 15 minutos. Finalizado este proceso, los bulbos fueron enjuagados 3 veces con agua destilada estéril con un intervalo de 5 minutos entre enjuague a enjuague, para eliminar los restos de la solución. (Figura 3)

Los bulbos desinfectados fueron transferidos a una placa Petri estéril, luego utilizando un estereoscopio binocular marca LEICA, se aislaron los meristemos con 1 o 2 primordios foliares con ayuda de pinzas y bisturís previamente esterilizados. (Figuras 4 y 5) Los meristemos aislados fueron sembrados en el medio para introducción *in vitro* e incubados a una temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, en condiciones de fotoperiodo de 16 hrs luz/8 hrs oscuridad. (Figuras 6)

3.4. Multiplicación clonal de *Eleutherine bulbosa*

Las plántulas provenientes de la etapa de introducción *in vitro* con un tamaño entre 3 a 5 cm y 120 días de cultivo fueron colocadas en una placa Petri estéril, donde se cortaron las hojas y raíces. A continuación, se aislaron los microbulbos con la ayuda de un bisturí y una pinza; y fueron sembrados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) suplementado con sacarosa (30g/L). Luego fueron incubados en la sala de crecimiento manteniendo las mismas condiciones como en la etapa de introducción.

3.4.1. Determinación del efecto de la sacarosa en la multiplicación y formación de microbulbos de *Eleutherine bulbosa*.

En los ensayos para determinar la concentración óptima de sacarosa para multiplicación clonal se utilizó medio MS en 5 tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa: tratamiento 1 (T1), 2 (T2), 3 (T3), 4 (T4) y 5 (T5) suplementados con: 30g/L, 60g/L, 90g/L, 120g/L y 150g/L de sacarosa, respectivamente. (Tabla 3)

A los 90 días de cultivo, las plántulas provenientes de la etapa de multiplicación fueron colocadas en una placa Petri estéril, y con ayuda de un bisturí y una pinza se aislaron los microbulbos. A continuación, estos fueron sembrados, un microbulbo por tubo e incubados en el cuarto de crecimiento a una temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en condiciones de fotoperiodo de 16hrs luz/8hrs oscuridad.

Se tomó como unidad experimental un (01) microbulbo por tubo, con doce repeticiones por tratamiento; donde se evaluaron el número de microbulbos a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días de cultivo *in vitro*. Luego se midió el diámetro los microbulbos obtenidos por cada tratamiento a los 180 días de cultivo utilizando un vernier marca KAMASA. (Figura 7)

3.4.2. Determinación del efecto de la sacarosa y 6-BAP en la multiplicación y formación de microbulbos de *Eleutherine bulbosa*.

En los ensayos para determinar la concentración óptima de sacarosa en combinación con 1mg/L de 6-BAP para multiplicación clonal se utilizó medio MS con 1mg/L de 6-BAP en 5 tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa: tratamiento 6 (T6), 7 (T7), 8 (T8), 9 (T9) y 10 (T10) suplementados con: 30g/L, 60g/L, 90g/L, 120g/L y 150g/L de sacarosa, respectivamente. (Tabla 3)

A los 90 días de cultivo, las plántulas provenientes de la etapa de multiplicación fueron colocadas en una placa Petri estéril, y con ayuda de un bisturí y una pinza

se aislaron los microbulbos. A continuación, estos fueron sembrados, un microbulbo por tubo e incubados en el cuarto de crecimiento a una temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en condiciones de fotoperiodo de 16hrs luz/8hrs oscuridad.

Se tomó como unidad experimental un (01) microbulbo por tubo, con doce repeticiones por tratamiento; donde se evaluaron el número de microbulbos a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días de cultivo *in vitro*. Luego se midió el diámetro de los microbulbos obtenidos por cada tratamiento a los 180 días de cultivo utilizando un vernier marca KAMASA. (Figura 7)

3.4.3. Determinación del efecto de la sacarosa y Kinetina en la multiplicación y formación de microbulbos de *Eleutherine bulbosa*.

En los ensayos para determinar la concentración óptima de sacarosa en combinación con 1mg/L de Kin para multiplicación clonal se utilizó medio MS con 1mg/L de Kin en 5 tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa: tratamiento 11 (T11), 12 (T12), 13 (T13), 14 (T14) y 15 (T15) suplementados con: 30g/L, 60g/L, 90g/L, 120g/L y 150g/L de sacarosa, respectivamente. (Tabla 3)

A los 90 días de cultivo, las plántulas provenientes de la etapa de multiplicación fueron colocadas en una placa Petri estéril, y con ayuda de un bisturí y una pinza se aislaron los microbulbos. A continuación, estos fueron sembrados, un microbulbo por tubo e incubados en el cuarto de crecimiento a una temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en condiciones de fotoperiodo de 16hrs luz/8hrs oscuridad.

Se tomó como unidad experimental un (01) microbulbo por tubo, con doce repeticiones por tratamiento; donde se evaluaron el número de microbulbos a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días de cultivo *in vitro*. Luego se midió el diámetro de los microbulbos obtenidos por cada tratamiento a los 180 días de cultivo utilizando un vernier marca KAMASA. (Figura 7)

3.5. Diseño experimental y análisis estadístico

Se evaluaron 15 tratamientos para la determinar la concentración óptima de sacarosa en combinación con citoquininas para la multiplicación y obtención de microbulbos de *Eleutherine bulbosa*. Cada microbulbo representó una unidad experimental, se evaluó el número y diámetro de microbulbos. Los resultados fueron analizados con el Software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 23. Se aplicó la prueba de normalidad Shapiro Wilk, y luego la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para determinar la existencia de diferencias significativas en cada uno de los tratamientos ($P < 0.05$).

4. RESULTADOS

4.1 Desinfección e introducción *in vitro* de meristemas

Se desinfectaron 15 bulbos con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2.5% con un tiempo de exposición de 15 minutos. A continuación, se realizó el aislamiento de los meristemas, en esta operación se retiró cuidadosamente las capas (hojas) externas hasta encontrar los meristemas; algunos bulbos presentaron de 2 a 3 yemas laterales, a las cuales también se le retiró las hojas hasta obtener el meristemo. En total, 30 meristemas con 1 ó 2 primordios foliares fueron aislados y sembrados en un medio MS suplementado con 30g/L de sacarosa. Como resultado se obtuvo 25 meristemas que no se contaminaron lo cual representa un porcentaje de 83.3% mientras que 5 meristemas se contaminaron con *Micrococcus sp.* o *Aspergillus sp.*, esto representa un porcentaje de 6.67% y 10%, respectivamente.

A los 90 días de cultivo se observó el desarrollo de plántulas con 30 a 40mm de longitud, las cuales presentaron entre 2 a 3 hojas lanceoladas de color verde claro y microbulbos de color verde o blanco (Figura 8); transcurrido 120 días de cultivo, estas plántulas lograron formar hasta 3 microbulbos por tubo o magenta. De los 25 meristemas introducidos *in vitro*: 4 no formaron microbulbos, 18 formaron 2 microbulbos y 3 formaron 3 microbulbos, dando un total de 49 microbulbos de *E. bulbosa* (Figura 9). La diferencia entre la formación de microbulbos probablemente se debe a que no todos los meristemas aislados e introducidos *in vitro* estuvieron lo suficientemente desarrollados al momento de la introducción, lo cual nos demuestra el desarrollo lento de algunos meristemas a los 120 días de cultivo en comparación a los que formaron 3 microbulbos.

4.2 Multiplicación clonal de *Eleutherine bulbosa*

En este ensayo los microbulbos obtenidos en la etapa de introducción (49 microbulbos) fueron transferidos a un medio de cultivo fresco de la misma

composición (MS + 30g/L sacarosa), a los 90 días de cultivo se observó la formación de 3 a 4 microbulbos por plántula. Obteniéndose en 39 plántulas la formación de 4 microbulbos mientras que, en 10 plántulas se observó la formación de 3 microbulbos, dando un total de 186 microbulbos en 90 días (Figura 10).

Estos microbulbos fueron utilizados en los ensayos de determinación de la concentración óptima de sacarosa e influencia de fitohormonas como: 6-BAP y Kinetina para la multiplicación clonal de esta especie.

4.2.1. Determinación del efecto de la sacarosa en la multiplicación y formación de microbulbos de *Eleutherine bulbosa*

A los 30 días de cultivo se analizó visualmente las plántulas desarrolladas en cada uno de los 5 tratamientos, observándose en los tratamientos T1 (30g/L de sacarosa-control), T2 (60g/L de sacarosa), T3 (90g/L de sacarosa) y T4 (120g/L de sacarosa) entre 2 a 3 hojas de color verde, el desarrollo hasta de 4 raíces por plántula y, microbulbos de forma alargada y color rosado; donde se obtuvo un promedio de número de microbulbos (promedio \pm error estándar) de 2.40 ± 0.27 , 2.33 ± 0.26 , 2.55 ± 0.28 y 2.33 ± 0.43 microbulbos/explante, respectivamente. Estos resultados muestran que no hubo diferencia en el desarrollo de microbulbos en los primeros 4 tratamientos. Por otra parte, en el tratamiento T5 (150g/L de sacarosa) no se observó el desarrollo de microbulbos ni hojas verdaderas, obteniéndose un promedio de número de microbulbos de 1.17 ± 0.11 microbulbos/explante, además en el medio de cultivo se evidenció un exudado de color amarillo (Figura 11, 13 y Tabla 3)

Los resultados a los 60 días de cultivo demuestran que en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 se mantuvo el desarrollo de raíces de buena apariencia y hojas de color verde, así como de microbulbos de forma alargada y color rosado, sin embargo, en los tratamientos T3 y T4 se observó entre 1 a 2 microbulbos de color violáceo parecidos a los bulbos de la planta madre. El promedio de número de microbulbos en el tratamiento T1 aumentó de 2.40 ± 0.27 a 3.50 ± 0.43 mientras que, en el tratamiento T2 de 2.33 ± 0.26 a 3.83 ± 0.44 , en el tratamiento T3 de 2.55 ± 0.28 a

4.36 ± 0.39 y por último en el tratamiento T4 de 2.33 ± 0.43 a 3.75 ± 0.58 microbulbos/explante, respectivamente. Estos resultados muestran que el tratamiento enriquecido con 90g/L de sacarosa fue donde se obtuvo el mayor número de microbulbos con 4.36 ± 0.39 microbulbos/explante. Por otro lado, en el tratamiento T5, no se observó el desarrollo de microbulbos manteniéndose un promedio de número de microbulbos de 1.17 ± 0.11 microbulbos/explante y el medio de cultivo presentó un exudado de color amarillo similar a lo observado a los 30 días de cultivo. (Figura 11, 14 y Tabla 3)

Los resultados obtenidos a los 90 días de cultivo en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 fueron similares a los observados a los 30 y 60 días, sin embargo, en el tratamiento T4 algunos microbulbos presentaron forma cónica redondeada y en todos los tratamientos se observó la fenolización parcial de las raíces. El promedio de número de microbulbos en el tratamiento T1 aumentó de 3.50 ± 0.43 a 4.50 ± 0.54 mientras que, en el tratamiento T2 de 3.83 ± 0.44 a 5.00 ± 0.44, en el tratamiento T3 de 4.36 ± 0.39 a 5.36 ± 0.47 y por último en el tratamiento T4 de 3.75 ± 0.58 a 6.66 ± 0.86 microbulbos/explante, respectivamente. Observándose en el tratamiento suplementado con 120g/L de sacarosa el mayor número de microbulbos con 6.66 ± 0.86 microbulbos/explante. Por otra parte, en el tratamiento T5, se observó en 2 unidades experimentales (2 tubos), el desarrollo de nuevos brotes, mientras que en 10 unidades experimentales (10 tubos), los microbulbos presentaron un color amarillo con partes necrosadas, así como la presencia de un exudado de color amarillo más oscuro a lo observado a los 60 días en el medio de cultivo; el promedio de número de microbulbos fue de 1.25 ± 0.18 microbulbos/explante (Figura 11, 15 y Tabla 3)

A los 120 días de evaluación en los tratamientos T1, T2 y T3 se mantuvo la fenolización parcial de las raíces y el desarrollo de microbulbos de forma alargada y color rosado, además se observó las primeras hojas de color amarillo con apariencia seca en cada una de las plántulas de los tratamientos (T1, T2 y T3). El promedio de número de microbulbos en el tratamiento T1 aumentó de 4.50 ± 0.54 a 5.00 ± 0.67 mientras que, en el tratamiento T2 de 5.00 ± 0.44 a 5.83 ± 0.60 y en

el tratamiento T3 de 5.36 ± 0.47 a 6.64 ± 0.54 microbulbos/explante, respectivamente. Además, en el tratamiento T4 se observó el desarrollo de nuevas raíces y hojas, las cuales fueron pequeñas en comparación a las observadas en los tratamientos T1, T2 y T3, además los microbulbos mantuvieron forma alargada o cónica redondeada y color rosado; se obtuvo un promedio de 7.33 ± 0.99 microbulbos/explante. Por otro lado, en el tratamiento T5, se observó microbulbos de color amarillo totalmente necrosados mientras que, el medio de cultivo adquirió una tonalidad pardo amarillento y el promedio fue de 1.33 ± 0.22 microbulbos/explante. (Figura 12, 16 y Tabla 3)

A los 150 días de cultivo en los tratamientos T1, T2 y T3 se observó la fenolización total a nivel de las raíces, mayor cantidad de hojas de color amarillo con apariencia seca por plántula, y el desarrollo de microbulbos de forma alargada y color rosado. El promedio de número de microbulbos aumentó en el tratamiento T1 de 5.00 ± 0.67 a 5.60 ± 0.72 mientras que, en el tratamiento T2 de 5.83 ± 0.60 a 6.41 ± 0.65 y en el tratamiento T3 de 6.64 ± 0.54 a 7.64 ± 0.53 microbulbos/explante, respectivamente. Los resultados obtenidos en el tratamiento T4 son similares a los observados a los 120 días, sin embargo, la mayoría de los microbulbos desarrollados presentaron un color violáceo y el promedio aumentó de 7.33 ± 0.99 a 8.17 ± 1.19 microbulbos/explante. Por último, en el tratamiento T5, no se observó el desarrollo de microbulbos y el promedio se mantuvo en 1.33 ± 0.22 microbulbos/explante. (Figura 12, 17 y Tabla 3)

Los resultados obtenidos a los 180 días de cultivo en los tratamientos T1, T2 y T3 fueron similares a los observados a los 150 días, con la única diferencia del incremento del número de hojas muertas en los tratamientos T1 y T2; el promedio de número de microbulbos fue de 6.20 ± 0.84 , 6.75 ± 0.66 y 8.09 ± 0.41 microbulbos/explante, respectivamente. Mientras que, en el tratamiento T4 se observó el engrosamiento de raíces y hojas verdes con buena apariencia, pero pequeñas con respecto a las observadas en los tratamientos T1, T2 y T3; el promedio de número de microbulbos aumentó de 8.17 ± 1.19 a 9.58 ± 1.49 microbulbos/explante, siendo este el mejor tratamiento para obtener el mayor

número de microbulbos una vez transcurrido 180 días de cultivo. Por otro lado, en el tratamiento T5, no se observó el desarrollo de microbulbos y el promedio de número de microbulbos se mantuvo en 1.33 ± 0.22 microbulbos/explante. (Figura 12, 18 y Tabla 3)

Se evaluó los microbulbos obtenidos en cada tratamiento: En los tratamientos T1 y T2, se obtuvieron 62 y 83 microbulbos de forma alargada y color rosado con un diámetro promedio (promedio \pm error estándar) de 2.55 ± 0.12 mm y 3.24 ± 0.08 mm, respectivamente. Mientras que, en el tratamiento T3 se lograron obtener 93 microbulbos de forma alargada y color rosado o violáceo con un diámetro promedio de 3.40 ± 0.07 mm. Asimismo, en el tratamiento T4 se obtuvo 108 microbulbos los cuales presentaron forma alargada o cónica redondeada de color rojizo violáceo propio de los bulbos en el campo, por otra parte, se evidenció que la mayoría de microbulbos mostraron un color violáceo blanquecino; el diámetro promedio fue de 3.47 ± 0.08 mm. Por último, en el tratamiento T5 sólo se obtuvo 16 microbulbos con un diámetro promedio de 2.37 ± 0.11 mm, al suplementar el medio de cultivo con 150g/L de sacarosa inhibe el desarrollo de microbulbos así como de hojas y raíces. (Figuras 19, 38 y Tabla 6)

4.2.2. Determinación del efecto de la sacarosa y 6-BAP en la multiplicación y formación de microbulbos de *Eleutherine bulbosa*

A los 30 días de cultivo se observó en los tratamientos T1 (30g/L de sacarosa - control), T6 (30g/L de sacarosa+1mg/L 6-BAP) y T7 (60g/L de sacarosa+1mg/L 6-BAP) el desarrollo de microbulbos de forma alargada y color rosado, a excepción en el tratamiento T6 (30g/L de sacarosa+1mg/L 6-BAP) donde estos fueron de color blanco o verde claro; el promedio de número de microbulbos fue de 2.40 ± 0.27 , 2.64 ± 0.28 y 1.83 ± 0.11 microbulbos/explante, respectivamente. Mientras que, en los tratamientos T8 (90g/L de sacarosa+1mg/L 6-BAP), T9 (120g/L de sacarosa+1mg/L 6-BAP) y T10 (150g/L de sacarosa+1mg/L 6-BAP), los microbulbos fueron de color violáceo y forma cónica redondeada; el promedio de número de microbulbos fue de 2.00 ± 0.17 , 1.83 ± 0.11 y 1.17 ± 0.11

microbulbos/explante, respectivamente. En todos los tratamientos se observó la formación de hojas verdes y raíces de buena apariencia. (Figura 20, 22 y Tabla 4)

Los resultados a los 60 días de cultivo muestran que los tratamientos T1, T6 y T7 mantuvieron las características observadas en los microbulbos a los 30 días de evaluación, pero el desarrollo de hojas verdes y raíces de buena apariencia fue mejor en los tratamientos T1 y T6. El promedio de número de microbulbos aumentó en el tratamiento T1 de 2.40 ± 0.27 a 3.50 ± 0.43 mientras que, en el tratamiento T6 de 2.64 ± 0.28 a 4.00 ± 0.45 y en el tratamiento T7 de 1.83 ± 0.11 a 2.58 ± 0.15 microbulbos/explante, respectivamente. En los tratamientos T8, T9 y T10 los microbulbos mantuvieron la forma cónica redondeada y color violáceo, pero solamente se observó el desarrollo de 1 a 2 raíces por plántula mientras que, en los tratamientos T9 y T10 se observó hojas con bordes de apariencia seca. El promedio de número de microbulbos fue de 2.17 ± 0.24 , 1.92 ± 0.15 y 1.42 ± 0.23 microbulbos/explante, respectivamente. (Figura 20, 23 y Tabla 4)

Los resultados obtenidos a los 90 días de cultivo en los tratamientos T1, T6 y T7 fueron similares a los observados a los 30 y 60 días. El promedio de número de microbulbos aumentó en el tratamiento T1 de 3.50 ± 0.43 a 4.50 ± 0.54 mientras que, en el tratamiento T6 de 4.00 ± 0.45 a 5.18 ± 0.63 y en el tratamiento T7 de 2.58 ± 0.15 a 3.33 ± 0.14 microbulbos/explante, respectivamente. Observándose en el tratamiento suplementado con 30g/L de sacarosa en combinación con 1mg/L de 6-BAP, el mayor número de de microbulbos con 5.18 ± 0.63 microbulbos/explante. En los tratamientos T8 y T9 se observó hojas de color amarillo, deformes y de apariencia seca, por otra parte, en el tratamiento T10 sólo se observó hojas muertas; en estos tres tratamientos sólo se desarrollaron entre 1 a 2 raíces por plántula mientras que, los microbulbos mantuvieron la forma y color observado a los 30 y 60 días de cultivo. El promedio de número de microbulbos fue de 2.50 ± 0.31 , 2.00 ± 0.12 y 1.58 ± 0.23 microbulbos/explante, respectivamente. (Figura 20, 24 y Tabla 4)

A los 120 días de evaluación en los tratamientos T1, T6 y T7, los microbulbos mantuvieron su forma alargada y color rosado, a excepción en el tratamiento T6

donde estos fueron de color blanquecino, las hojas fueron de color verde y las raíces estuvieron parcialmente fenolizadas. El promedio de número de microbulbos aumentó en el tratamiento T1 de 4.50 ± 0.54 a 5.00 ± 0.67 mientras que, en el tratamiento T6 de 5.18 ± 0.63 a 6.45 ± 0.74 y en el tratamiento T7 de 3.33 ± 0.14 a 3.92 ± 0.19 microbulbos/explante, respectivamente. En los tratamientos T8, T9 y T10 se observaron hojas deformes y muertas, y entre 1 a 2 raíces por plántula mientras que, los microbulbos mantuvieron la forma cónica redondeada y color violáceo. El promedio de número de microbulbos fue de 2.75 ± 0.30 , 2.58 ± 0.19 y 1.58 ± 0.23 microbulbos/explante, respectivamente. (Figura 21, 25 y Tabla 4)

A los 150 días de cultivo en el tratamiento T1 se observó la fenolización total a nivel de las raíces, mayor cantidad de hojas de color amarillo con apariencia seca por plántula mientras que, en los tratamientos T6 y T7 las hojas mantuvieron su color verde y los microbulbos en estos tres tratamientos presentaron las mismas características observadas a los 120 días. El promedio de número de microbulbos aumentó en el tratamiento T1 de 5.00 ± 0.67 a 5.60 ± 0.72 mientras que, en el tratamiento T6 de 6.45 ± 0.74 a 7.10 ± 0.71 y en el tratamiento T7 de 3.92 ± 0.19 a 4.92 ± 0.15 microbulbos/explante, respectivamente. Los resultados obtenidos en los tratamientos T8, T9 y T10 fueron similares a los observados a los 120 días de cultivo, el promedio de número de microbulbos fue de 3.10 ± 0.31 , 3.00 ± 0.17 y 1.58 ± 0.23 microbulbos/explante, respectivamente. (Figura 21, 26 y Tabla 4)

Los resultados observados a los 180 días de cultivo en el tratamiento T1 muestran hojas muertas, la fenolización total de las raíces y el desarrollo de microbulbos de forma alargada y color rosado, con un promedio de 6.20 ± 0.84 microbulbos/explante de 2.55 ± 0.12 mm de diámetro promedio. En el tratamiento T6 las hojas mantuvieron buena apariencia y los microbulbos fueron de forma alargada y color blanquecino, con un promedio de 8.09 ± 0.73 microbulbos/explante de 2.45 ± 0.10 mm de diámetro promedio. Mientras que, en el tratamiento T7 se observó hojas muertas y el desarrollo de microbulbos de forma alargada y color rosado, pero más gruesos que los observados en el

tratamiento T1, con un promedio de 5.58 ± 0.23 microbulbos/explante de 3.28 ± 0.11 mm de diámetro promedio. Por otra parte, en los tratamientos T8, T9 y T10 se observaron hojas muertas, 1 o 2 raíces totalmente fenolizadas por plántula y microbulbos de color rojizo violáceo y forma cónica redondeada. El promedio fue de 3.33 ± 0.38 , 3.33 ± 0.19 y 1.66 ± 0.22 microbulbos/explante con un diámetro promedio de 4.45 ± 0.15 , 4.00 ± 0.14 y 4.43 ± 0.13 mm, respectivamente. (Figura 21, 27, 28, 38 y Tabla 4, 6)

4.2.3. Determinación del efecto de la sacarosa y Kinetina en la multiplicación y formación de microbulbos de *Eleutherine bulbosa*

A los 30 días de cultivo se observó en los tratamientos T1 (30g/L de sacarosa-Control), T11 (30g/L de sacarosa+1mg/L Kin) y T12 (60g/L de sacarosa+1mg/L Kin) el desarrollo de microbulbos de color rosado y forma alargada, a excepción en el tratamiento T12 (60g/L de sacarosa+1mg/L Kin) donde estos fueron de color violáceo; el promedio de número de microbulbos fue de 2.40 ± 0.27 , 2.00 ± 0.12 y 1.92 ± 0.15 microbulbos/explante, respectivamente. Mientras que, en los tratamientos T13 (90g/L de sacarosa+1mg/L Kin) y T14 (120g/L de sacarosa+1mg/L Kin) se observaron microbulbos de forma cónica redondeada y color violáceo, pero en el tratamiento T14 estos fueron de color rosado; el promedio de número de microbulbos fue de 1.17 ± 0.11 y 1.10 ± 0.83 microbulbos/explante, respectivamente. En estos 5 tratamientos se observaron el desarrollo de hojas de color verde y raíces de buena apariencia. Por otra parte, en el T15 (150g/L de sacarosa+1mg/L Kin) se observó hojas de color amarillo con apariencia seca, microbulbos de forma alargada y color rosado; el promedio de número de microbulbos fue de 1.10 ± 0.83 microbulbos/explante. (Figura 29, 31 y Tabla 5)

Los resultados a los 60 días de cultivo demuestran que en los tratamientos T1, T11 y T12 se mantuvieron las características observadas en los microbulbos a los 30 días de evaluación. El promedio aumentó en el tratamiento T1 de 2.40 ± 0.27 a 3.50 ± 0.43 mientras que, en el tratamiento T11 de 2.00 ± 0.12 a 2.58 ± 0.15 y en el tratamiento T12 de 1.92 ± 0.15 a 2.50 ± 0.23 microbulbos/explante,

respectivamente. Además, en los tratamientos T13 y T14, las hojas fueron de color verde y los microbulbos mantuvieron forma cónica redondeada y color violáceo, sin embargo en el tratamiento T14 estos fueron de color rosado. El promedio de número de microbulbos fue de 1.33 ± 0.19 y 1.15 ± 0.45 microbulbos/explante, respectivamente. Por otro lado, en el tratamiento T15 se observó hojas de color amarillo con apariencia seca, así como microbulbos de forma alargada y color rosado; el promedio de número de microbulbos fue de 1.17 ± 0.11 microbulbos/explante. (Figura 29, 32 y Tabla 5)

Los resultados obtenidos a los 90 días de cultivo en los tratamientos T1, T11 y T12 fueron similares a los observados a los 30 y 60 días. El aumento en el tratamiento T1 de 3.50 ± 0.43 a 4.50 ± 0.54 mientras que, en el tratamiento T11 de 2.58 ± 0.15 a 3.42 ± 0.19 y en el tratamiento T12 de 2.50 ± 0.23 a 3.58 ± 0.43 microbulbos/explante, respectivamente. Observándose en el tratamiento suplementado con 30g/L de sacarosa (Control) la mayor formación de microbulbos con 4.50 ± 0.54 microbulbos/explantes. En el tratamiento T13 se observó hojas de color verde, así como microbulbos con forma cónica redondeada y color violáceo; el promedio de número de microbulbos se mantuvo en 1.33 ± 0.18 microbulbos/explante. Además, en los tratamientos T14 y T15 se observó hojas deformes y muertas, y microbulbos con forma cónica redondeada y color rosado, a excepción en el tratamiento T15 que fueron de forma alargada; el promedio de número de microbulbos fue de 1.17 ± 0.11 y 1.23 ± 0.15 microbulbos/explante. (Figura 29, 33 y Tabla 5)

A los 120 días de evaluación en los tratamientos T1, T11 y T12 se observó hojas de color verde y raíces parcialmente fenolizadas, así como microbulbos de forma alargada y color rosado, a excepción en el tratamiento T12 donde estos fueron de color violáceo. El promedio de número de microbulbos aumentó en el tratamiento T1 de 4.50 ± 0.54 a 5.00 ± 0.67 mientras que, en el tratamiento T11 de 3.42 ± 0.19 a 4.08 ± 0.23 y en el tratamiento T12 de 3.58 ± 0.43 a 4.08 ± 0.41 microbulbos/explante, respectivamente. En T13 se observó hojas de color amarillo con apariencia seca y microbulbos con características similares a las observadas

a los 30, 60 y 90 días; el promedio de número de microbulbos fue de 1.58 ± 0.42 microbulbos/explante. Por otra parte, en los tratamientos T14 y T15 se observaron hojas deformes y muertas, así como microbulbos con forma cónica redondeada y color violáceo, además en el tratamiento T15 los microbulbos tuvieron una forma alargada; el promedio de número de microbulbos fue de 1.25 ± 0.18 y 1.23 ± 0.15 microbulbos/explante, respectivamente. (Figura 30, 34 y Tabla 5)

A los 150 días de cultivo en los tratamientos T1 y T11 se observó la fenolización total de las raíces, mayor cantidad de hojas de color amarillo con apariencia seca por plántula y microbulbos de forma alargada y color rosado, además en el tratamiento T11 algunos microbulbos adquirieron un color violáceo. El promedio de número de microbulbos aumentó en el tratamiento T1 de 5.00 ± 0.67 a 5.60 ± 0.72 y en tratamiento T11 de 4.08 ± 0.23 a 4.92 ± 0.15 microbulbos/explante. En el tratamiento T12 se observó hojas de color amarillo con apariencia seca y raíces gruesas de buena apariencia mientras que, los microbulbos fueron de forma ovalada y color violáceo con un promedio de número de microbulbos de 5.10 ± 0.53 microbulbos/explante. Por otro lado, en los tratamientos T13 y T14 se observaron raíces totalmente fenolizadas, hojas deformes y muertas, los microbulbos mantuvieron forma cónica redondeada y color violáceo; el promedio de número de microbulbos fue de 2.17 ± 0.24 y 1.33 ± 0.19 microbulbos/explante, respectivamente. Además, en el tratamiento T15 se observó hojas muertas y los microbulbos adquirieron un color amarillo; el promedio de número de microbulbos se mantuvo en 1.23 ± 0.15 microbulbos/explante. (Figura 30, 35 y Tabla 5)

Los resultados observados a los 180 días de cultivo en el tratamiento T1 muestran hojas muertas, la fenolización total de las raíces y la formación de microbulbos de forma alargada y color rosado con un promedio de 6.20 ± 0.84 microbulbos/explante de 2.55 ± 0.12 mm de diámetro promedio. Mientras que, en el tratamiento T11 los microbulbos fueron de forma cónica redondeada y color violáceo con un promedio de 5.92 ± 0.19 microbulbos/explante de 3.67 ± 0.10 mm de diámetro promedio. En el tratamiento T12 se observó hojas muertas y la formación de microbulbos con forma ovalada y color rojizo violáceo, similar a los

bulbos observados en el campo con un promedio de 5.58 ± 0.69 microbulbos/explante de 7.12 ± 0.15 mm de diámetro promedio. En T13, T4 y T15 se observaron hojas muertas, 1 o 2 raíces totalmente fenolizadas por plántula y microbulbos de color rojizo violáceo y forma cónica redondeada. El promedio fue de 2.42 ± 0.26 , 1.42 ± 0.19 y 1.25 ± 0.13 microbulbos/explante con diámetro promedio de 4.47 ± 0.16 , 4.42 ± 0.19 y 2.81 ± 0.13 mm, respectivamente (Figura 30, 36, 37, 38 y Tabla 5, 6).

5. DISCUSIÓN

5.1. Desinfección e introducción *in vitro* de meristemos

En esta investigación se obtuvo 83.3% de meristemos de *Eleutherine bulbosa* “yawar piri piri” desinfectados usando hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2.5% por un tiempo de exposición de 15 minutos. Los meristemos fueron sembrados en un medio de cultivo MS enriquecido con 30g/L de sacarosa; transcurrido 120 días de cultivo, las plántulas observadas lograron formar hasta 3 microbulbos por tubo o magenta, dando un total de 49 microbulbos de *E. bulbosa*. Estos resultados no coinciden con los de Hoesen (2010), quien reportó un 97% de explantes desinfectados de *Eleutherine sp*, no obstante, utilizaron una concentración de hipoclorito de sodio (NaOCl) de 30-40% por un tiempo de exposición de 20 minutos, siendo estas variables mayores, que las utilizadas en esta investigación. Por otra parte, los explantes fueron sembrados en medio MS y otro medio suplementado con 1mg/L 6-BAP, obteniendo un promedio de 2 y 6 microbulbos por magenta respectivamente, durante 45 días de cultivo. Este resultado, es mucho mayor que el obtenido en el presente estudio, debido a que Hoesen (2010), formó plántulas a partir de microbulbos con 0.3 a 0.5 cm de diámetro y empleó 6-BAP para acelerar la multiplicación de los microbulbos mientras que, en esta investigación se obtuvo plántulas a partir de meristemos, lo cual requiere un mayor tiempo de cultivo y sólo se utilizó medio MS suplementado con 30g/L de sacarosa sin reguladores de crecimiento.

Otros autores, utilizaron diferentes sistemas de desinfección con este tipo de explantes (bulbos), mas no reportaron presencia o ausencia de contaminación. Rice *et al.* (1983) emplearon NaOCl al 2% durante 10 minutos para desinfectar bulbos de *Tulipa “Merry Widow”* mientras que, Nagakubo *et al.* (1993) usaron NaOCl al 0.5% durante 10 minutos para desinfectar bulbos de *Allium sativum* L. Asimismo, Sultana *et al.* (2010) utilizaron una solución Clorox, con una concentración de 10-12% de NaOCl por 10 minutos para la producción *in vitro* de bulbos de *Hippeastrum hybridum*. Por otro lado, Paredes *et al.* (2014) emplearon

NaOCl al 2.5% en combinación con 2 gotas de Quix durante 15 minutos para la desinfección de los bulbos de *Traubia modesta*, obteniendo un porcentaje de contaminación entre el 50 al 80%.

El uso de la solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 2% al 5% es lo más recomendado en el cultivo de tejidos vegetales, ya que inhibe de forma irreversible, la actividad enzimática indispensable para el metabolismo celular en los microorganismos, así como la integridad de su membrana citoplasmática. (Abdelnour- Esquivel y Escalant 1994; Estrela *et al.*, 2002)

Alternativamente al uso de NaOCl, otros autores emplearon también cloruro de mercurio. Kumar *et al.* (2005) reportaron el uso de cloruro de mercurio al 0.1% por 30 minutos para la desinfección de los bulbos de *Ornithogalum virens*, mientras que Ascough y Van Staden (2010) desinfectaron los bulbos de *Albuca bracteata* con la inmersión de los explantes, en primer lugar, en una solución de NaOCl al 3.5% por 10 minutos y a continuación en una solución de cloruro de mercurio al 0.1% durante 10 minutos. En esta investigación no se utilizó esta solución desinfectante debido a su alto grado de toxicidad.

5.2. Multiplicación clonal de *Eleutherine bulbosa*.

Durante esta etapa se utilizaron los microbulbos que se obtuvieron en la etapa de introducción. Para la multiplicación clonal se requiere un medio de cultivo que contenga macro y micro nutrientes, así como una fuente de carbono como el azúcar. El medio basal propuesto por Murashigue y Skoog (1962) ha sido utilizado frecuentemente en la mayoría de especies micropropagadas *in vitro* (Kantha, 1981). En algunos casos es necesario el uso de dos grupos de fitorreguladores de crecimiento, auxinas y citoquininas (Thorpe, 1981).

En el presente trabajo se multiplicó microbulbos de *E. bulbosa* en el medio de cultivo MS suplementado con 30g/L de sacarosa, en el cual se observó el desarrollo normal de las plántulas y se logró obtener en total 186 microbulbos en 90 días de cultivo, entre 3 a 4 microbulbos por plántula. Este resultado no coincide con Hoesen (2010), quien reportó que en medio MS suplementado con 2mg/L de

6-BAP se obtuvo un promedio de 11 microbulbos por magenta a los 45 días de cultivo, logrando un mejor resultado que el observado en esta investigación. Esta respuesta podría atribuirse a una dosis de 2mg/L de 6-BAP utilizada por este autor, la cual estimula la formación de brotes axilares. (Jordán y Casaretto 2006)

5.2.1. Determinación del efecto de la sacarosa en la multiplicación y formación de microbulbos de *Eleutherine bulbosa*.

La sacarosa en concentraciones entre 2 al 4 %, constituyen la fuente de carbono más utilizada en los medios de cultivo ya que es sintetizada, transportada y metabolizada de manera natural en las plantas (Pierik, 1991).

Hasta el momento no existen estudios similares sobre el efecto de la adición de mayores concentraciones de sacarosa (60, 90, 120 y 150g/L) al medio de cultivo para la multiplicación y obtención de microbulbos en *Eleutherine bulbosa*, más sí se han reportado estudios en otras especies.

Los resultados en esta investigación muestran que en los primeros 30 días de cultivo no hubo diferencia entre el desarrollo de las plántulas en los primeros cuatro tratamientos (30, 60, 90 y 120g/L de sacarosa). Lo cual es corroborado, con los resultados de Kahane *et al.*, (1992) quienes observaron una mejor diferencia entre las plantas de *Allium cepa* L. a los 60 días de cultivo. Esto probablemente se debe a que las plántulas no eran lo suficientemente maduras para formar microbulbos en los primeros 30 días de cultivo. Asimismo, el promedio de número de microbulbos en el tratamiento 1 (30g/L de sacarosa) a los 30 días de cultivo fue de 2.40 ± 0.27 microbulbos/explante, mientras que Hoesen (2010) reportó un promedio de número de microbulbos de 2.00 ± 0.71 microbulbos/explante a los 45 días de cultivo de *Eleutherine sp*, estos resultados se encuentran dentro del rango obtenido en nuestra investigación.

Sin embargo, al aumentar la concentración de sacarosa a 60g/L, 90g/L y 120g/L en el medio de cultivo, se observó una mayor formación de microbulbos, esto concuerda con lo reportado en otras especies bulbosas por Rice *et al.* (1983), Kahane *et al.* (1992) y Keller (1993) quienes obtuvieron una mayor formación de

microbulbos a medida que aumentaron la concentración de sacarosa en el medio de cultivo.

Kahane *et al.* (1992) reportó que una concentración de 40g/L a 120g/L de sacarosa en el medio de cultivo, aumenta el número de microbulbos de *Allium cepa L.* de 2.00 a 3.10 microbulbos/explante en 80 días de cultivo. Asimismo, Chow *et al.* (1992) mencionó que hubo la formación de 71% de brotes en un medio de cultivo suplementado con 90g/L de sacarosa mientras que en un medio suplementado con 60g/L de sacarosa sólo se formó 49% de brotes de *Narcissus*. Kumar *et al.* (1999) estudiaron el efecto de tres concentraciones de sacarosa (80g/L, 100g/L y 120g/L) en *Gladiolus hybridus*, y observaron el aumento significativo de brotes de 18 brotes/explante en el medio con mayor concentración. Mientras que, en esta investigación se observó la mayor formación de microbulbos en un medio MS suplementado con 120 g/L de sacarosa, donde se obtuvo un promedio de 9.58 ± 1.49 microbulbos/explante, transcurrido 180 días de cultivo, lo que corrobora lo reportado por estos autores. Borges *et al.* (2005) señalaron que la efectividad de la sacarosa para la multiplicación *in vitro* puede atribuirse a que causa cambios en las fitohormonas endógenas, lo que conduce a la formación y crecimiento de nuevos brotes, quizás a través del ajuste osmótico del citosol en los tejidos o de la disponibilidad de ciertas enzimas asociadas con la utilización de la fuente de carbono. Según Chávez *et al.* (2010) el incremento de sacarosa promueve la brotación, ya que incrementa la cantidad de carbohidratos que se pueden almacenar en los brotes más aún si está en un medio rico en sales como el MS.

Por otro lado, los resultados obtenidos en esta investigación muestran que la adición de 150g/L de sacarosa inhibe la formación de microbulbos así como el desarrollo de hojas y raíces. Además, se observó la presencia de un exudado pardo amarillento en el medio de cultivo. Vega *et al.* (2015) mencionaron que este efecto se puede relacionar, a que todas las plantas pueden asimilar y absorber una cantidad limitada de sacarosa, un excedente podría causar un estrés osmótico. El cambio de color del medio de cultivo se debe a la presencia de

compuestos fenólicos, los cuales se encuentran principalmente en cultivos vegetales sometidos a estrés, causando la fenolización. Estudios de Benkeblia (2003) demostraron que los compuestos fenólicos interfieren indirectamente con el proceso de brotación. Asimismo, Thorpe (1985) señaló que la concentración de sacarosa puede inducir efectos dramáticos en el crecimiento y morfogénesis de las plantas. Sin embargo, nuestros resultados no coinciden con Keller (1993), quien obtuvo los mejores resultados en la formación de microbulbos de *Allium cepa* en una concentración de 150g/L de sacarosa. Las diferencias encontradas en los estudios reportados demuestran que cada genotipo requiere de una concentración particular de sacarosa para su cultivo *in vitro*.

En esta investigación, las plántulas de los tratamientos T1, T2 y T3 (30, 60 y 90g/L de sacarosa) formaron hasta 3 hojas de color verde y de 2 a 3 raíces por plántula cada 30 días, lo cual es corroborado por Macia (1994), donde menciona que la concentración de sacarosa promueve una mejor tasa de crecimiento, acelerando el metabolismo de las plantas. Además, los microbulbos obtenidos a los 180 días de cultivo, en estos tratamientos fueron de forma alargada y color rosado, en algunos casos en el tratamiento T3 se observó microbulbos de color violáceo. Sin embargo, en el tratamiento T4 (120g/L de sacarosa) se observó hojas más pequeñas en comparación con los tratamientos T1, T2 y T3 a los 180 días de cultivo. De acuerdo a Sakuta *et al.* (1987) el incremento de la concentración de sacarosa puede reducir el tamaño y número de células, asimismo Alvarenga - Venutolo *et al.* (2007) mencionan que el uso de osmoreguladores como la sacarosa, han sido favorables para retardar el desarrollo. Además, en este mismo tratamiento se observó las raíces más engrosadas, según Quero (2004) y Chávez *et al.* (2010), esto pudo deberse a que la sacarosa además de ser la fuente principal de carbono y energía también actúa en la formación de órganos como las raíces, y Jiménez (1995) llegó a la conclusión que las concentraciones altas de sacarosa en el medio de cultivo permiten lograr un crecimiento vigoroso de las raíces.

Por otro lado, en los resultados obtenidos en el T4 se observó la mayor cantidad de microbulbos con un promedio de 9.58 ± 1.49 microbulbos/explante y un diámetro de 3.47 ± 0.08 mm a los 180 días de cultivo, estos resultados concuerdan con lo reportado por Mohamed-Yasseen *et al.* (1995), quienes lograron la formación de microbulbos de *Allium sp.* en un medio enriquecido con 120g/L de sacarosa y 5g/L de carbón activado. Además, Heath y Hollies (1963) mencionan que el aumento del diámetro basal se debe al aumento de la concentración de azúcar que son fácilmente asimilados del medio de cultivo y no al aumento de la presión osmótica. Estos microbulbos fueron de forma alargada o cónico redondeada y en su mayoría presentaron un color blanquecino violáceo o violáceo, parecido al de la planta madre. El color violáceo o púrpura es característico de las antocianinas, es decir los bulbos de esta planta poseen estos compuestos. En este trabajo, se observó que, a mayor concentración de sacarosa en el medio de cultivo, los microbulbos adquirieron un color más violáceo. Lo cual es corroborado por Cormier *et al.* (1989), Decendit (1996), Kim y Kim (2002) y Miñano *et al.* (2004), quienes determinaron que la producción de antocianinas aumenta a medida que se incrementa la concentración de sacarosa. Sin embargo, cuando la concentración de sacarosa llega a niveles muy altos para ser asimilados por la especie, disminuye la producción de antocianinas, es por esta razón posiblemente que los microbulbos obtenidos en el tratamiento suplementado con 120g/L de sacarosa han perdido en muchos casos su color violáceo.

5.2.2. Determinación del efecto de la sacarosa y 6-BAP en la multiplicación y desarrollo de microbulbos de *Eleutherine bulbosa*.

Los resultados obtenidos muestran que en el tratamiento suplementado con 30g/L de sacarosa y 1mg/L de 6-BAP se obtuvo un promedio de 4.00 ± 0.45 microbulbos/explante a los 60 días de cultivo, este resultado difiere con lo reportado por Hoesen (2010), quien obtuvo a los 45 días de cultivo, un promedio de 6.20 ± 1.10 microbulbos/explante de *Eleutherine sp* en un medio suplementado con 1mg/L de 6-BAP. Esta diferencia, demuestra que la especie, *Eleutherine sp*, es un genotipo más productivo que el utilizado en esta investigación. Sin embargo,

en este tratamiento se logró obtener un promedio de 8.09 ± 0.73 microbulbos/explante a los 180 días de cultivo, estos microbulbos fueron de forma alargada y de color blanco, no se observó la formación de un bulbo propiamente dicho con características similares a las de la planta madre. Este resultado ocurre, debido a que conforme avanzan los días, los explantes van absorbiendo los componentes del medio de cultivo, lo que contribuye a su maduración y permite la formación de brotes y/o microbulbos. Lo que coincide con Dunstan y Short (1977), Hussey (1978), Mohamed – Yassen *et al.* (1995) y Medina *et al.* (2004), quienes reportaron que sembrar explantes en un medio de cultivo enriquecido con 6-BAP produce mayor cantidad de brotes y/o microbulbos que en un medio no suplementado con esta fitohormona. Asimismo, Nagakubo *et al.* (1993), obtuvieron una mayor tasa de bulbificación en *Allium sativum* L (128 de bulbos en 8 meses) cuando suplementaron el medio de cultivo con 1mg/L de 6-BAP. Mujica y Mogollón (2004) concluyeron que incorporar la fitohormona 6-BAP en el medio de cultivo estimula el desarrollo de microbulbos en el 100% de los cultivos, de acuerdo a estos resultados se podría considerar que la eficiencia en la inducción de microbulbos depende del tipo y concentración de citoquinina en el medio de cultivo.

Por otra parte, Keller (1993), reportó que la fitohormona 6-BAP sólo es capaz de estimular la formación de bulbos en *Allium cepa*, siempre y cuando todos los otros factores sean controlados de manera óptima (Fotoperiodo, equilibrio hormonal apropiado, etc.) caso contrario retrasa la formación de los mismos, razón por la cual concluyó que el rol de las citoquininas en la formación de órganos de reserva es contradictorio. Lo cual es corroborado por García *et al.* (2004), quienes obtuvieron una respuesta negativa a la tuberización de *Dioscorea alata* L. variedad *Cartagena* utilizando un medio de cultivo suplementado con 0.5mg/L de 6-BAP. Por otra parte, Ascough y Van Standen (2010) reportaron que una concentración de 1mg/L de 6-BAP inhibe la formación de bulbos en *Albuca bracteata*, planta ornamental.

En los tratamientos suplementados con 90g/L, 120g/L y 150g/L de sacarosa en combinación con 1mg/L de BAP, se observó un desarrollo lento de microbulbos. Es posible que el incremento de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo induce el estrés en los explantes, lo cual inactiva las funciones de la fitohormona (6-BAP) para la formación de yemas y rompimiento de la dominancia apical. Sin embargo, en estos tratamientos los microbulbos presentaron una forma cónica redondeada y de color rojizo violáceo, con un diámetro promedio de 4.45 ± 0.15 , 4.00 ± 0.14 y 4.43 ± 0.13 mm respectivamente. Esto demuestra, el sinergismo que existe entre la concentración de sacarosa y la fitohormona 6-BAP, que induce a la formación de microbulbos, con características similares a la planta madre en condiciones de campo. Estos resultados, corrobora los trabajos realizados por Kato (1965) y Mann (1983), quienes reportaron que las altas concentraciones de sacarosa, estimulan que el tejido basal de *Allium cepa* funcione como sumidero y formé bulbos más vigorosos.

Además, la forma y color rojizo violáceo observado en los microbulbos obtenidos se puede explicar, a que las concentraciones mayores a 30g/L de sacarosa incrementan la producción de metabolitos secundarios (antocianinas), como mencionan Cormier *et al.* (1989), Decendit (1996), Kim y Kim (2002) y Miñano *et al.* (2004). Asimismo, Mori *et al.* (1994) y Gómez-Zeledón *et al.* (2011), reportaron que la incorporación de citoquininas en el medio del cultivo incrementa la síntesis de antocianinas.

5.2.3. Determinación del efecto de la sacarosa y Kinetina en la multiplicación y formación de microbulbos de *Eleutherine bulbosa*

Los resultados obtenidos indican que la kinetina, a una concentración de 1mg/L en combinación con 30g/L y 60g/L de sacarosa, mejora la proliferación de microbulbos. Lo cual es corroborado con los resultados de Castro y Londoño (2008), quienes obtuvieron el mayor número de microbulbos en *Lilium sp.*, utilizando medio MS suplementado con 1mg/L de kinetina en combinación con 60g/L de sacarosa. Mientras que, Martínez *et al.* (2012) lograron la formación de yemas en *Sorghum bicolor* utilizando un medio MS suplementado con una

concentración de 0.10 y 0.21 mg/L de kinetina. Ascough *et al.* (2009) mencionaron que el uso de altas concentraciones de sacarosa (6-38%), citoquininas (Kinetina), así como factores de fotoperiodo y temperatura acelera la formación de microbulbos.

En la presente investigación, al evaluar los resultados obtenidos en el tratamiento 1 (30g/L de sacarosa-control), se logró obtener microbulbos de forma alargada y de color rosado. Sin embargo, los microbulbos obtenidos en el tratamiento 11(30g/L de sacarosa + 1mg/L Kin) presentaron forma cónica redondeada y de color violáceo, con un diámetro promedio de 3.67 ± 0.10 mm; mientras que, los microbulbos obtenidos en el tratamiento 12 (60g/L de sacarosa+1mg/L Kin) presentaron forma ovalada y de color rojizo violáceo, con un diámetro promedio de 6.78 ± 0.15 mm, estos últimos similares a la planta madre.

6. CONCLUSIONES

1. En el medio MS suplementado con 60g/L de sacarosa y 1mg/L de Kinetina se logró obtener en promedio 5.58 ± 0.69 microbulbos/explante con 7.12 ± 0.15 mm de diámetro, de forma ovalada y color rojizo violáceo, similares o idénticos a los de la planta madre.
2. En el medio MS suplementado con 120g/L de sacarosa, se obtuvo en promedio 9.58 ± 1.49 microbulbos/explante con 3.47 ± 0.08 mm de diámetro, siendo este el mejor tratamiento en 180 días de cultivo; sin embargo, en el tratamiento suplementado con 150g/L de sacarosa no se observó la proliferación de microbulbos.
3. En el medio MS suplementado con 30g/L de sacarosa y 1mg/L de 6-BAP se logró obtener en promedio 8.09 ± 0.73 microbulbos/explante con 2.45 ± 0.10 mm de diámetro, de forma alargada y color blanco.
4. En el medio MS suplementado con 60g/L de sacarosa y 1 mg/L de 6-BAP se logró obtener en promedio 5.58 ± 0.23 microbulbos/explante con 3.28 ± 0.11 mm de diámetro, de forma alargada y color rosado; mientras que en los medios de cultivos enriquecidos con 90, 120 y 150g/L de sacarosa y 1mg/L de 6-BAP, se logró obtener en promedio 3.33 ± 0.38 mm, 3.33 ± 0.19 mm y 1.66 ± 0.22 mm microbulbos/explante con un diámetro de 4.45 ± 0.15 mm, 4.00 ± 0.14 mm y 4.43 ± 0.21 mm, de forma cónica redondeada y de color rojizo violáceo, respectivamente.
5. En el medio de MS suplementado con 30g/L de sacarosa, se logró obtener 186 plántulas *in vitro* de *Eleutherine bulbosa* en 90 días de cultivo, entre 3 a 4 plántulas por unidad experimental.

6. El hipoclorito de sodio (NaOCl) a una concentración de 2.5% con un tiempo de exposición de 15 minutos permitió obtener un 83.3% de explantes exentos de patógenos.

7. RECOMENDACIONES

1. Realizar bioensayos con los extractos obtenidos a partir de microbulbos *in vitro* de *Eleutherine bulbosa* “yawar piri piri” para comprobar su acción anticonceptiva y antitumoral.
2. Evaluar otras concentraciones y combinaciones de fitohormonas en la multiplicación y obtención de microbulbos de *Eleutherine bulbosa* “yawar piri piri”
3. Determinar los principios activos en los extractos obtenidos a partir de microbulbos *in vitro* de *Eleutherine bulbosa* “yawar piri piri”.

8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abdelnour Esquivel A, Escalant JV. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CATIE, Turrialba (Costa Rica); 1994.
- Alvarenga-Venutolo S, Abdelnour-Esquivel A, Villalobos-Aránbula V. Conservación *in vitro* de chayote (*Sechium edule*). Agronomía Mesoamericana. Universidad de Costa Rica; 2007; 18(1):65–73.
- Ascough G, Erwin J, Van Staden J. Micropropagation of iridaceae. Plant Cell Tissue Organ Culture. 2009 (97): 1-19
- Ascough G, Van Staden. Micropropagation of *Albuca bracteata* and *A. nelsonii* – Indigenous ornamentals with medicinal value. South African Journal of Botany 2010(76): 579-584.
- Benkeblia N. Low Temperature and Breaking of Dormancy Effects on Respiration Rate, Sugars, Phenolics and Peroxidase Activity Changes in Inner Buds of Onion *Allium cepa* L. Acta Agric. Scand., Sect. B, Soil and Plant Sci. 2003 (53):16-20.
- Borges García M, Malaurie B, Viltres SP, Campos DC. Efecto de distintas concentraciones de sacarosa en la conservación *in vitro* de coco (*Cocos nucifera* L.). Universidad Nacional de Colombia; 2008.
- Castro D, Londoño S. Producción *in vitro* de microbulbos de lirio (*Lilium* sp). Temas Agrarios. 2008; 13(1).
- Cormier F, Crevier H, Bao C. Effects of sucrose concentration on the accumulation of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera*) cell suspension. Canadian Journal Botany. 1989 (68): 1822-1825.
- Chávez M, Feria M, Barbón R, Jiménez F, La O M. Características morfológicas de plantas *in vitro* de *Pinus caribaea* var. *caribaea* influenciadas por el empleo de la sacarosa en la fase de multiplicación. Biotecnología Vegetal. 2010 (10): 31-40.

- Chow YN, Selby C, Harvey B. Stimulation by sucrose of *Narcissus bulbil* formation *in vitro*. Journal of horticultural science. Taylor & Francis; 1992; 67(2):289–293.
- Decendit A, Mérillon J. Condensed tannin and anthocyanin production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. Plant Cell Reports 1996 (15): 762-765.
- Dunstan D, Short K. Improved Growth of Tissue Cultures of the Onion, *Allium cepa*. Physiology Plant. 1977(41): 70-72
- Espinosa A, Salas L, González O, Silva J. Empleo del ácido abscísico, manitol y la disminución de las sales del medio de cultivo en la conservación *in vitro* de *Ipomoea batatas*. Biotecnología Vegetal. 2002; 2(1):39–42.
- Estrela C, Barbin E, Spano J, Marchesan M, Pecora J. Mechanism of Action of Sodium Hypochlorite. BrazDEnt (2002) 13(2):113-117
- Forzza RC, Leitman PM, Costa A, Carvalho Jr AA de, Peixoto AL, Walter BMT, et al. Catálogo de plantas e fungos do Brasil-Vol. 1. JBRJ; 2010.
- García M, Escalona M, Meneses S. Efecto de la concentración de sacarosa y de reguladores del crecimiento en la tuberización *in vitro* de *Dioscorea alata* L. variedad Cartagena. Biotecnología vegetal. 2004 (4):243-246.
- García-Águila L, de Fera M, Acosta K, others. Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. Biotecnología Vegetal 2007; 7(2) 67–79.
- Gerrits M, Klerk G-J. Dry-matter partitioning between bulbs and leaves in plantlets of *Lilium speciosum* regenerated *in vitro*. Acta botanica neerlandica. Wiley Online Library; 1992; 41(4):461–468.
- Goldblatt P, Rodriguez A, Powell M, Davies JT, Manning JC, Van der Bank M, et al. Iridaceae 'out of Australasia'? Phylogeny, biogeography, and divergence time based on plastid DNA sequences. Systematic Botany. American Society of Plant Taxonomists; 2008; 33(3):495–508.
- Gómez-Zeledón J, Jiménez V, Cigras D. *In vitro* Production of Anthocyanins. Acta Biológica Colombiana. 2011(16):3-20

- Heath O, Hollies M. Studies in the Physiology of the Onion Plant. *Journal of Experimental Botany*. 1963(16): 128-144
- Hodge WH, Taylor D. The ethnobotany of the island Caribs of Dominica. *Webbia* 1956; 12: 513-644.
- Hoesen D. Teknik Budidaya *in vitro* *Eleutherine* sp. *J. Tek. Ling.* 2010 Vol. 11 (3): 341-351.
- Hussey G. *In vitro* propagation of the Onion *Allium cepa* by axillary and adventitious shoot proliferation. *Scientia Horticulturae*. 1978 (9): 227-236.
- Ifesan B, Hamtasin C, Mahabusarakam W, Voravuthikunchai S. Inhibitory effect of *Eleutherine americana* Merr. extract on *Staphylococcus aureus* isolated from food. *Journal of food science*. Wiley Online Library; 2009; 74(1):31–36.
- Jiménez, E. Propagación *in vitro* de la caña (*Saccharum* ssp). Hibrido. Tesis Doctorado UCLV, Cuba. 1995.
- Jórdan M, Casaretto J. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. *Fisiología Vegetal*. Ediciones Universidad de La Serena. 2006.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PS, Donoghue MJ. *Plant systematics: A phylogenetic approach*. Sinauer, Sunderland. 2008. pp 611
- Kahane R, Teyssendier De La Serve B, Rancillac M. Bulbing in Long- day Onion (*Allium cepa* L.) Cultured *in vitro*: Comparison Between Sugar Feeding and Light Induction. *Annals of Botany*, 1992(69): 551-555
- Kato T. Physiological studies on bulb formation and dormancy in the onion plant. V. The relation between the metabolism of carbohydrates, nitrogen compounds and auxin and the bulbing phenomenon. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 1965(34): 43-51.

- Kartha K. Meristem cultura and cryopreservation: methods and applications. En: Plant tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture. T.A. Thorpe (ed). New York: Academic Press. 1981. pp 181-211.
- Keller E. Sucrose, cytokinin, and ethylene influence formation of *in vitro* bulblets in onion and leek. Genetic Resources and Crop Evolution. Springer; 1993; 40(2):113–120.
- Kim S, Kim S. Effect of Nitrogen Source on Cell Growth and Anthocyanin Production in Callus and Cell Suspension Culture of “Sheridan Grapes”. Journal of Plant Biotechnology. 2002 (4): 83-89
- Krikorian A. Propagación clonal *in vitro*. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones, CIAT, Cali, Colombia. 1991; 95–125.
- Kumar P, Nayak S. Different modes of plant regeneration and factors affecting *in vitro* bulblet production in *Ornithogalum virens*. Science Asia 2005(31): 409-414
- Kumar A, Sood A, Palni L, Gupta A. *In vitro* propagation of *Gladiolus hybridus* Hort.: Synergistic effect of heat shock and sucrose on morphogenesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 1999 (57): 105-112.
- Lans C. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. Journal of ethnobiology and ethnomedicine. BioMed Central; 2007; 3(1):1.
- Lercari B. The effect of far-red light on the photoperiodic regulation of carbohydrate accumulation in *Allium cepa* L. Physiologia Plantarum. Wiley Online Library; 1982; 54(4):475–479.
- Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. 2010
- Macia RJ. Conservação *in vitro* de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). 1994

- Martínez S, Gómez R, Posada L, Barbón R, Acosta M, Reyes M. Efecto de dos citoquininas, ácido ascórbico y sacarosa en la obtención de plantas *in vitro* de *Sorghum bicolor* para la formación de callos. Revista Colombiana de Biotecnología. 2012(2): 101-110.
- Medina R, Faloci M, Marassi M, Mroginski. Genetic stability in rice micropropagation. Biocell 2004 (28): 13-20.
- Mejía E; Rengifo E. Plantas medicinales de uso popular en la Amazonia peruana. 2000. pp. 211-212
- Miñano A, Chico J, López E, Sisniegas M, Bobadilla M. Efecto de la concentración de sacarosa en la producción de antocianinas a partir de cultivos celulares de *Vitis vinifera* L. var. *red globe*. Revista peruana de biología. 2004(11): 187-192.
- Mohamed-Yasseen Y, Barringer SA, Splittstoesser WE. *In vitro* bulb production from *Allium spp. in vitro* Cellular \ Developmental Biology-Plant. Springer; 1995; 31(1):51–52.
- Mori T. Use of Auxin And Cytokinin to Regulate Anthocyanin Production and Composition in Suspension Cultures of Strawberry Cell. Journal Science Food Agriculture. 1994 (65):271-276.
- Mujica H, Mogollón N. Bulbificación *in vitro* del ajo (*Allium sativum* L.) con adición de citocininas y sacarosa en el medio de cultivo. Bioagro. Universidad Centroccidental“Lisandro Alvarado”(UCLA); 2004;16(1):55–60.
- Murashige T, Skoog F. Physiol. Plant.1962; 15: 473–497.
- Nagakubo T, Nagasawa A, Ohkawa H. Micropropagation of garlic through *in vitro* bulblet formation. Plant cell, tissue and organ culture. Springer; 1993; 32(2):175–183.
- Nobécourt P. Nouvelles recherches sur la culture des tissus végétaux. Bulletin de la Société Botanique de France. Taylor & Francis; 1940; 87(1):117–120.
- Paredes K, Delaveau C, Carrasco P, Baeza C, Mora F, Uribe M. *In vitro* bulbing for the propagation of *Traubia modesta* (Amaryllidaceae), a threatened plant endemic to Chile. Ciencia e Investigación Agraria. 2014 41(2): 207-214.

- Pérez J.; Albany N.; Vilchez J.; León de S.; Molina M. Efecto del medio de cultivo en la multiplicación *in vitro* de *Aloe barbadensis* Mill. Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía, Departamento de Química. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2010, 27: 447-459.
- Pierik R.L.M; Commercial micropropagation in Western Europe and Israel. In: Micropropagation of horticultural crops. Edit. P.C. Debergh and R.H. Zimmerman, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1991. pp. 157-165.
- Pinedo P, Rengifo M, Cerruti E, Pinedo TM. Plantas medicinales de la amazonia peruana: estudio de su uso y cultivo. 1997. Pp. 253-254
- Quero, A. P. Propagación *in vitro* y evaluación en la fase de vivero de la piña (*Ananas comosus* L. Merr). C.V Española Roja. 2004
- Rayas A, Mederos V, García M, López J, Cabrera M, Ventura J, et al. Estudio de medios de cultivo para la conservación *in vitro* de la yuca. Biotecnología Vegetal. 2002; 2(4):249–251.
- Rice R, Alderson P, Wright N. Induction of bulbing of tulip shoots *in vitro*. Scientia Horticulturae. 20(1983) 377-390.
- Sakuta M, Takagi T, Komamine A. Effects of sucrose on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca Americana*. Physiologia Plantarum. 1987 (71): 455-458.
- Schultes, R.E., and R.F. Raffauf. The healing forest: Medicinal and toxic plant of the Northwest Amazonia (Historical, Ethno-& Economic Botany). Discorides Press, Portland, Oregon, USA. 1990; 2:484
- Segretin ME. Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología. 2006

- Shibuya H, Fukushima T, Ohashi K, Nakamura A, Riswan S, Kitagawa I. Indonesian Medicinal Plants. XX. Chemical Structures of Eleuthosides A, B, and C, Three New Aromatic Glucosides from the Bulbs of *Eleutherine palmifolia* (Iridaceae). Chemical and pharmaceutical bulletin. The Pharmaceutical Society of Japan; 1997; 45(7):1130–1134.
- Sultana J, Sultana N, Siddique N, Islam A, Hossain M, Hossain T. *In vitro* bulb production in Hippeastrum (*Hippeastrum Hybridum*). Central European Agriculture. 2010. Volume 11 N° 4 (469 – 474)
- Thorpe T. Growth and behavior of cell cultures: Embryigenesis and organogenesis. En: plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic press. 1981.pp 82-86
- Thorpe T. Carbohydrate utilization and metabolism. Tissue Culture in Forestry. Forestry Sciences. 1985. pp. 325-368
- Urban I. *Sertum antillanum. VI. Repertorium novarum specierum regni vegetabilis.* Wiley Online Library; 1918; 15(20-24):305–323.
- Vega J, Arahana V, Torres M. Estandarización de un protocolo de regeneración de cebolla chalote (*Allium cepa* var. *aggregatum*) a partir de meristemas apicales. Avances en Ciencias e Ingenierías. 2015 (7): 24-31
- Weniger B, Haag-Berrurier M, Anton R. Plants of Haiti used as antifertility agents. Journal of Ethnopharmacology. Elsevier; 1982; 6(1):67–84.
- White PR. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. American Journal of Botany. JSTOR; 1939; 59–64.
- Zel J, Debeljak N, Ucman Ravnikar M. The effect of jasmonic acid, sucrose and darkness on garlic (*Allium sativum* L. cv. Ptujski Jenseški) bulb formation *in vitro*. In Vitro Cell. Dev. Biol Plant; 1997 (33):231-235

9. ANEXOS

9.1 Figuras



Figura 1. Mapa de ubicación del “Jardín botánico de plantas medicinales de Allpahuayo”. Distrito de Iquitos, provincia de Maynas, Región de Loreto



Figura 2. Bulbos de *Eleutherine bulbosa* “yawar piri piri” recolectados en del “Jardín botánico de plantas medicinales de Allpahuayo”



Figura 3. Proceso de esterilización de explantes de *E. bulbosa* “yawar piri piri”

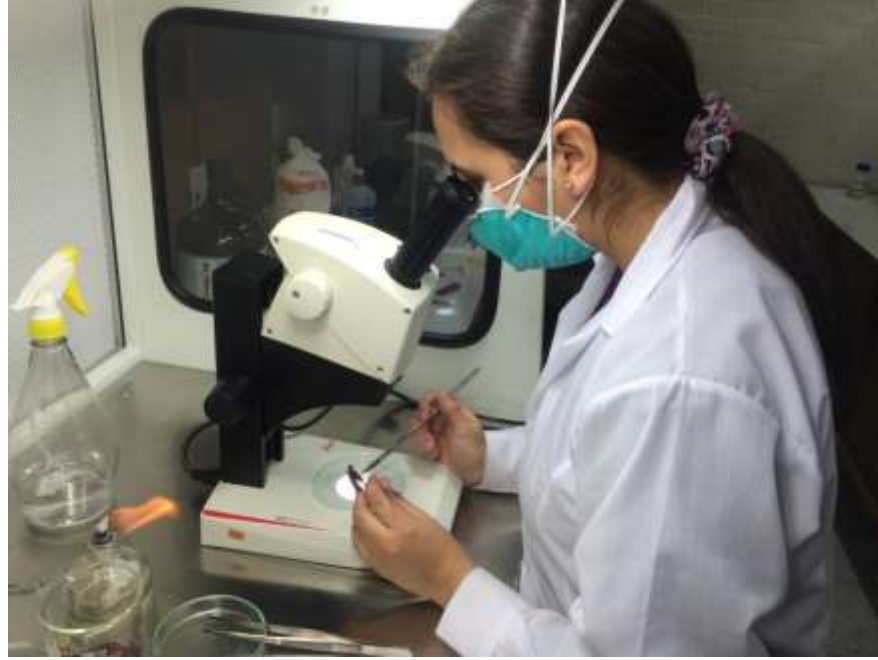


Figura 4. Proceso de aislamiento de los meristemas.



Figura 5. Meristemo de *Eleutherine bulbosa* “yawar piri piri”.



Figura 6. Proceso de introducción *in vitro* de meristemo de *E. bulbosa*.



Figura 7. Evaluación de microbulbos obtenidos *in vitro* de *E. bulbosa*.



Figura 8. Plántula *in vitro* de *E. bulbosa* a los 90 días de cultivo.

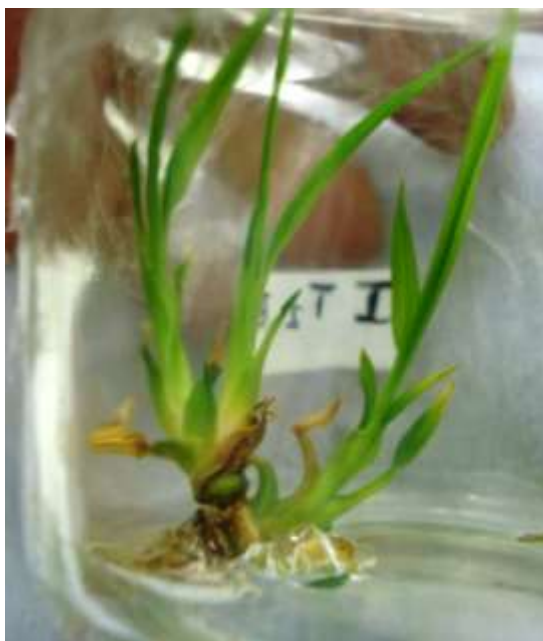


Figura 9. Plántulas *in vitro* de *E. bulbosa* a los 120 días de cultivo.



Figura 10. Multiplicación clonal de E. bulbosa “yawar piri” *in vitro*.

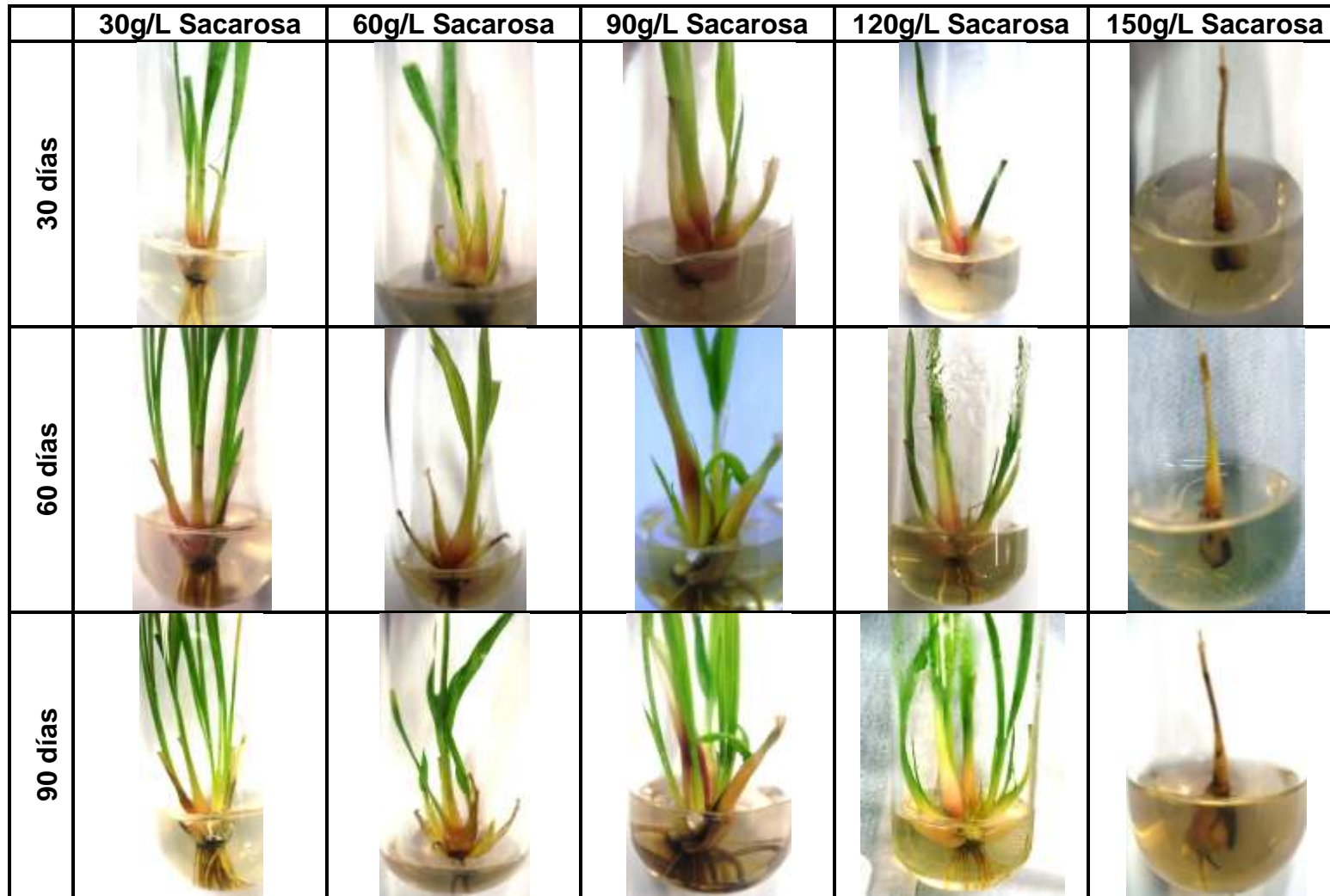


Figura 11. Plántulas *in vitro* en diferentes concentraciones de sacarosa (30, 60, 90, 120 y 150 g/L) a los 30, 60 y 90 días de cultivo.

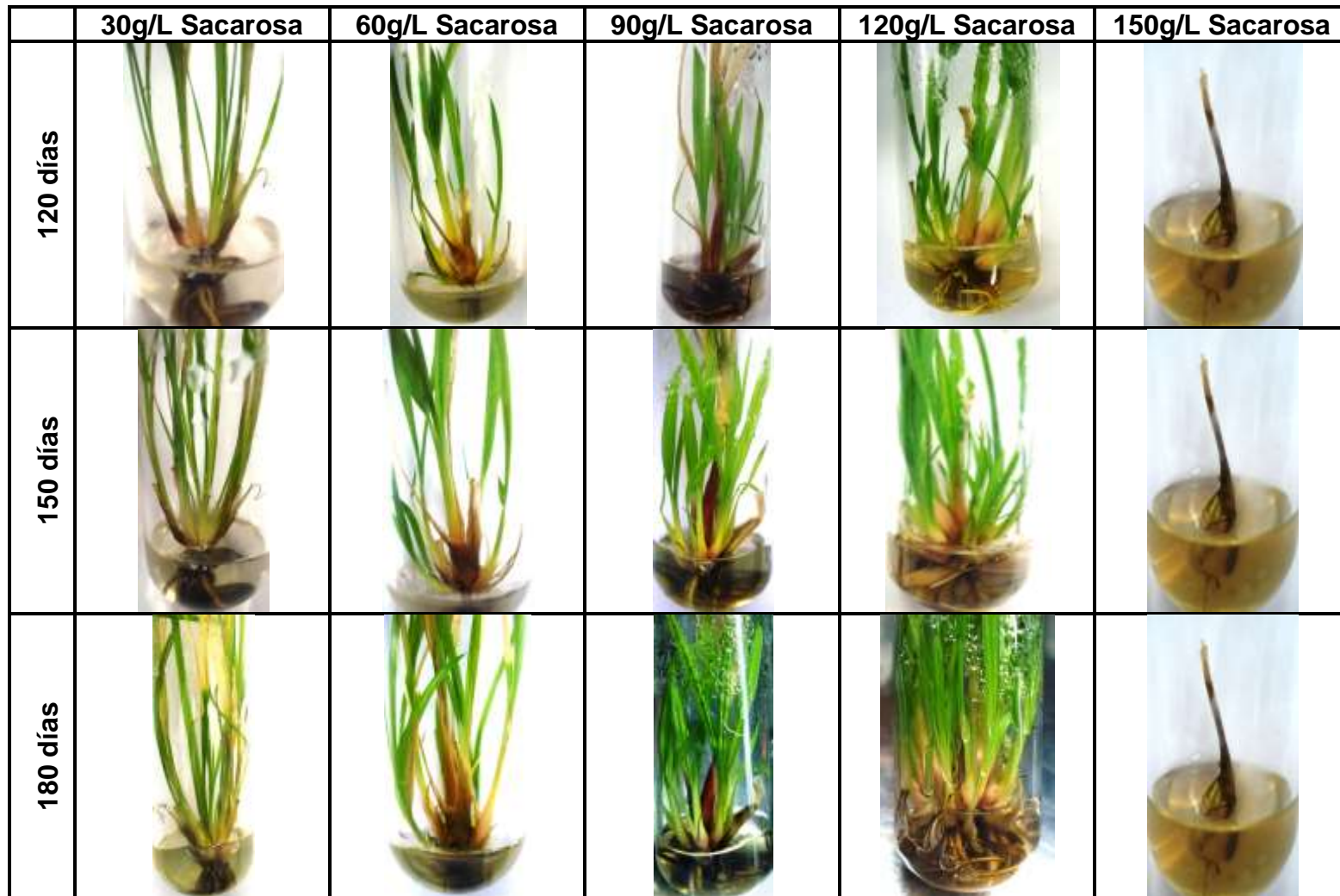


Figura 12. Plántulas *in vitro* en diferentes concentraciones de sacarosa (30, 60, 90, 120 y 150 g/L) a los 120, 150 y 180 días de cultivo.

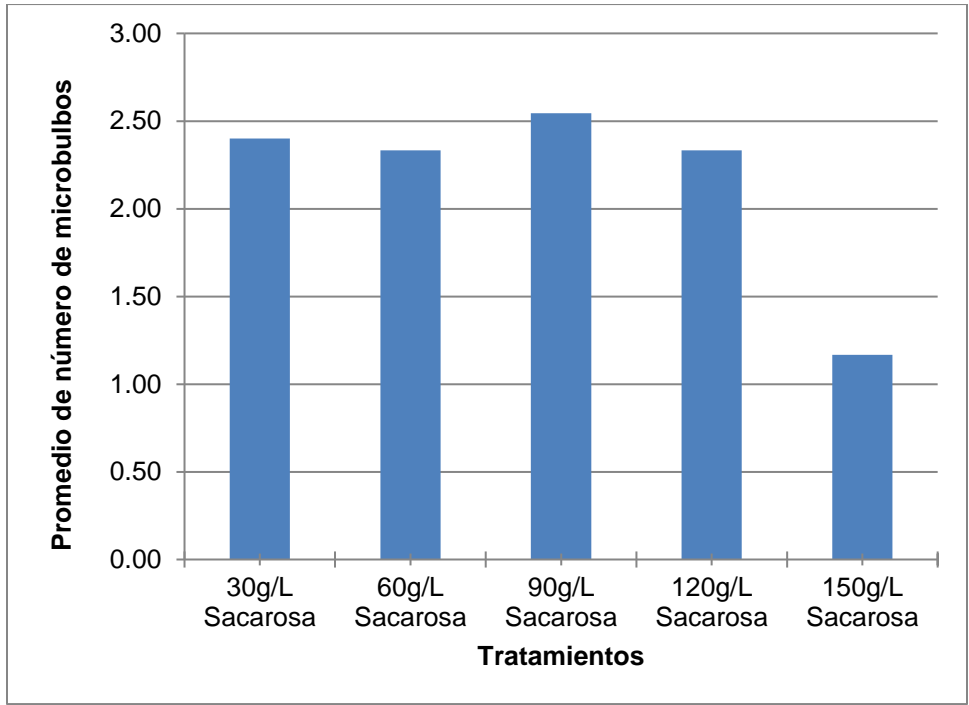


Figura 13. Influencia de sacarosa en la formación del número de microbulbos a los 30 días

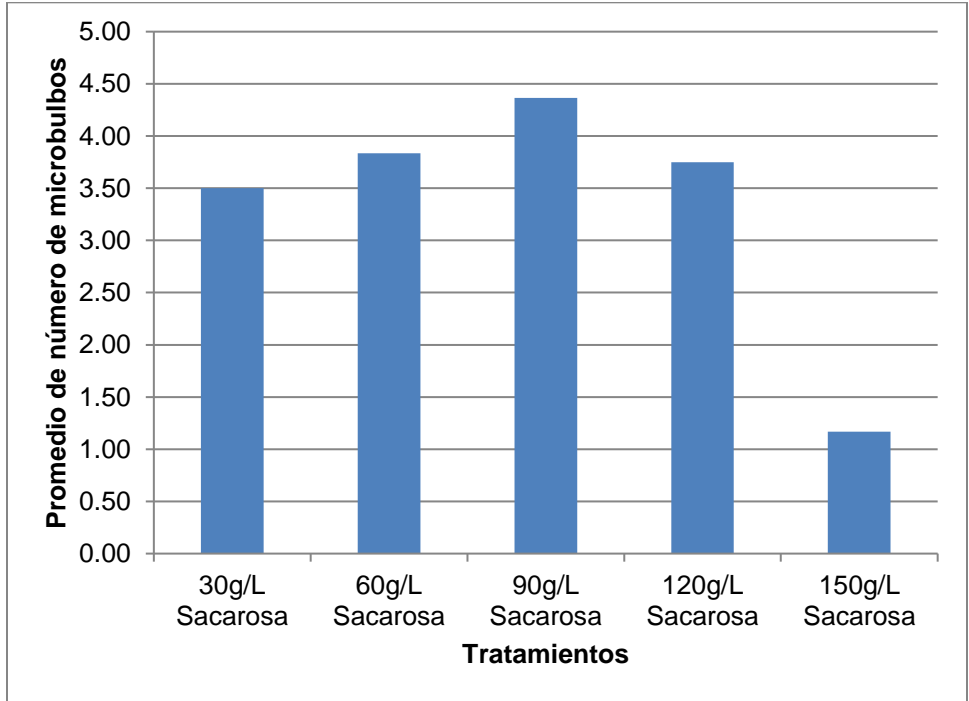


Figura 14. Influencia de sacarosa en la formación del número de microbulbos a los 60 días

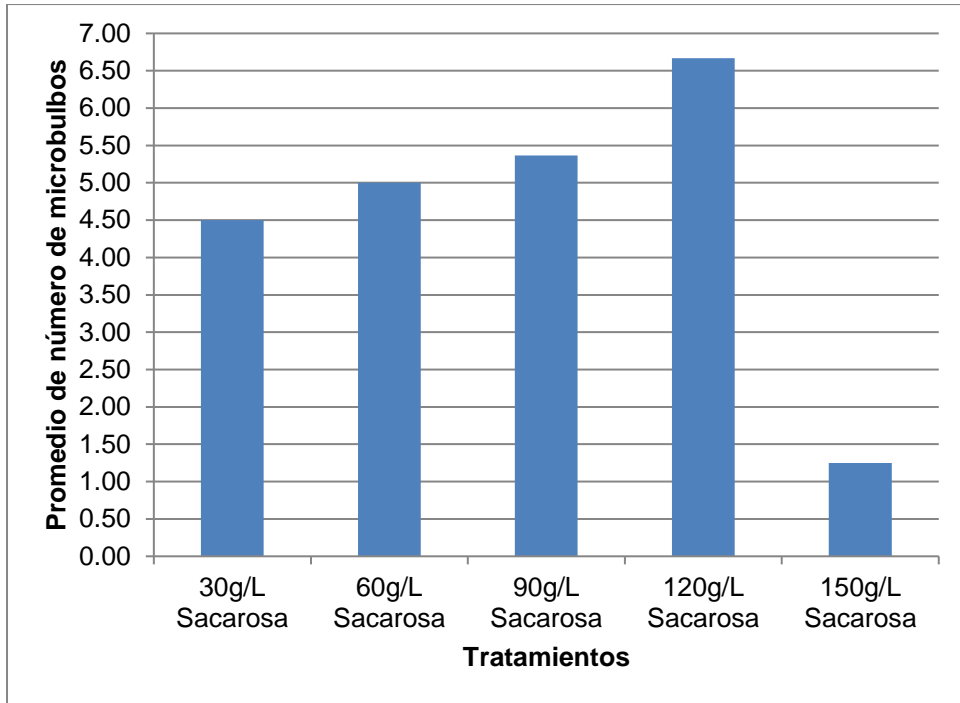


Figura 15. Influencia de sacarosa en la formación del número de microbulbos a los 90 días.

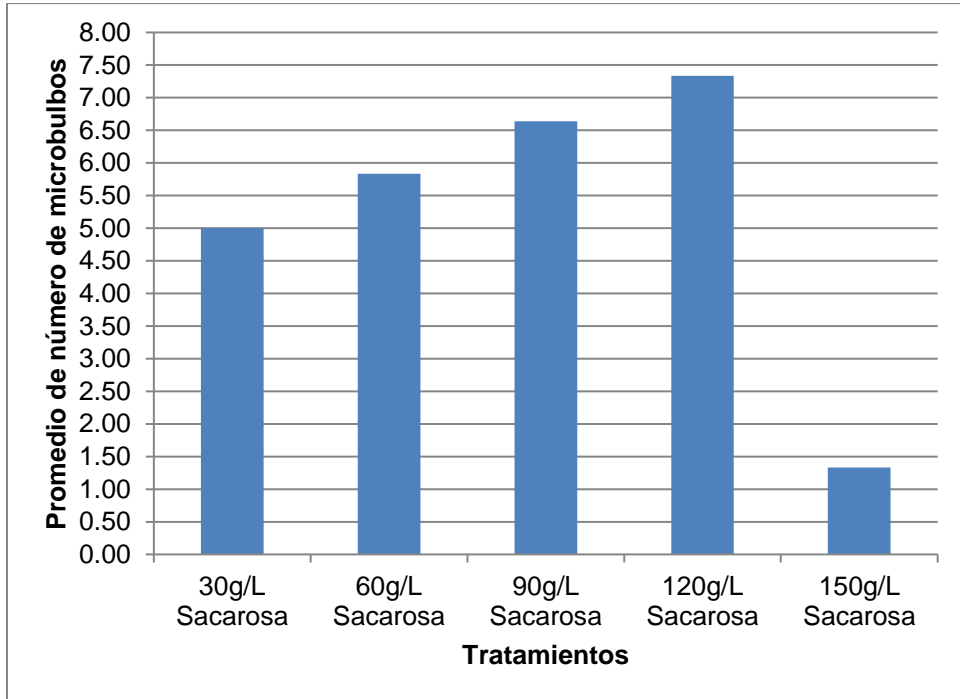


Figura 16. Influencia de sacarosa en la formación del número de microbulbos a los 120 días.

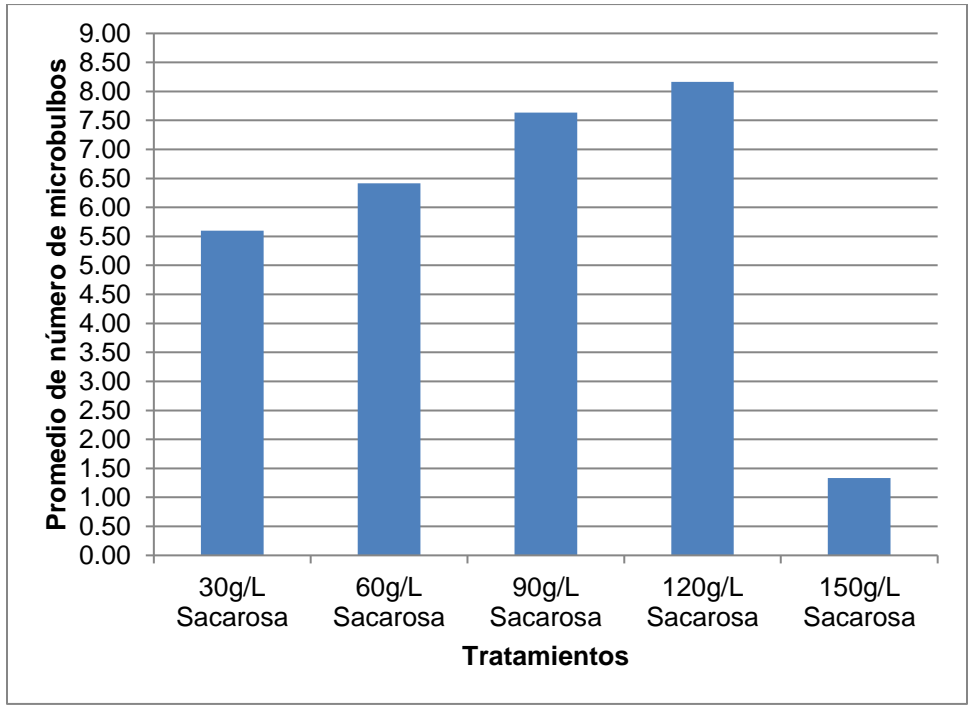


Figura 17. Influencia de sacarosa en la formación del número de microbulbos a los 150 días.

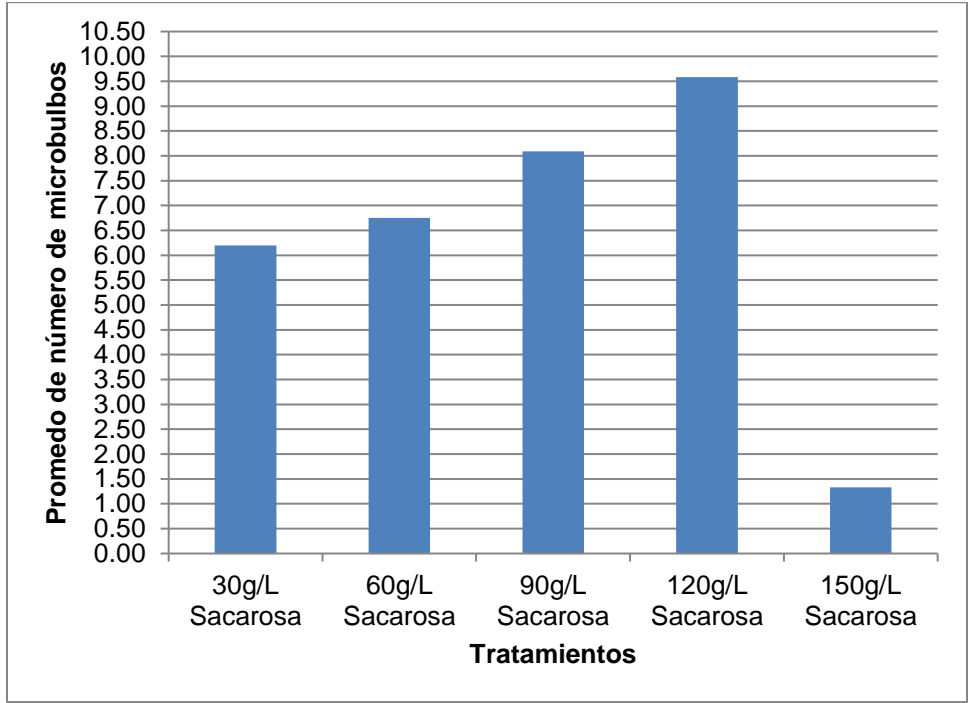


Figura 18. Influencia de sacarosa en la formación del número de microbulbos a los 180 días.

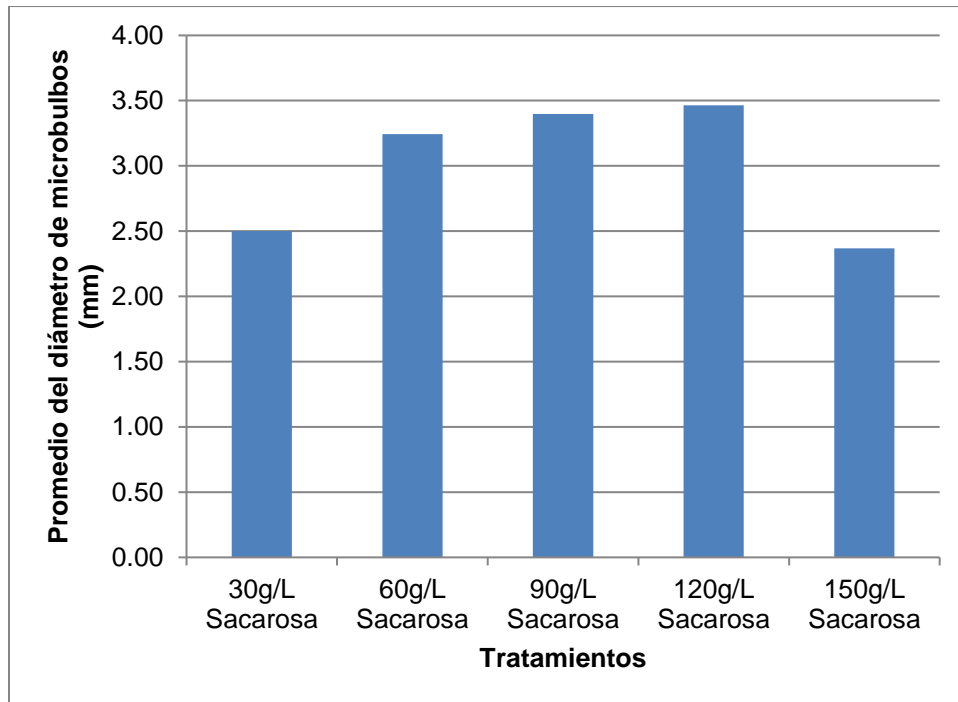


Figura 19. Influencia de sacarosa en el diámetro de microbulbos a los 180 días.



















	30g/L Sacarosa (Control)	30g/L Sacarosa+ 1mg/L 6-BAP	60g/L Sacarosa + 1mg/L 6-BAP	90g/L Sacarosa + 1mg/L 6-BAP	120g/L Sacarosa + 1mg/L 6-BAP	150g/L Sacarosa + 1mg/L 6-BAP
30 días						
60 días						
90 días						

Figura 20. Plántulas *in vitro* en diferentes concentraciones de sacarosa (30, 60, 90, 120 y 150 g/L) y 6-BAP a los 30, 60 y 90 días de cultivo.

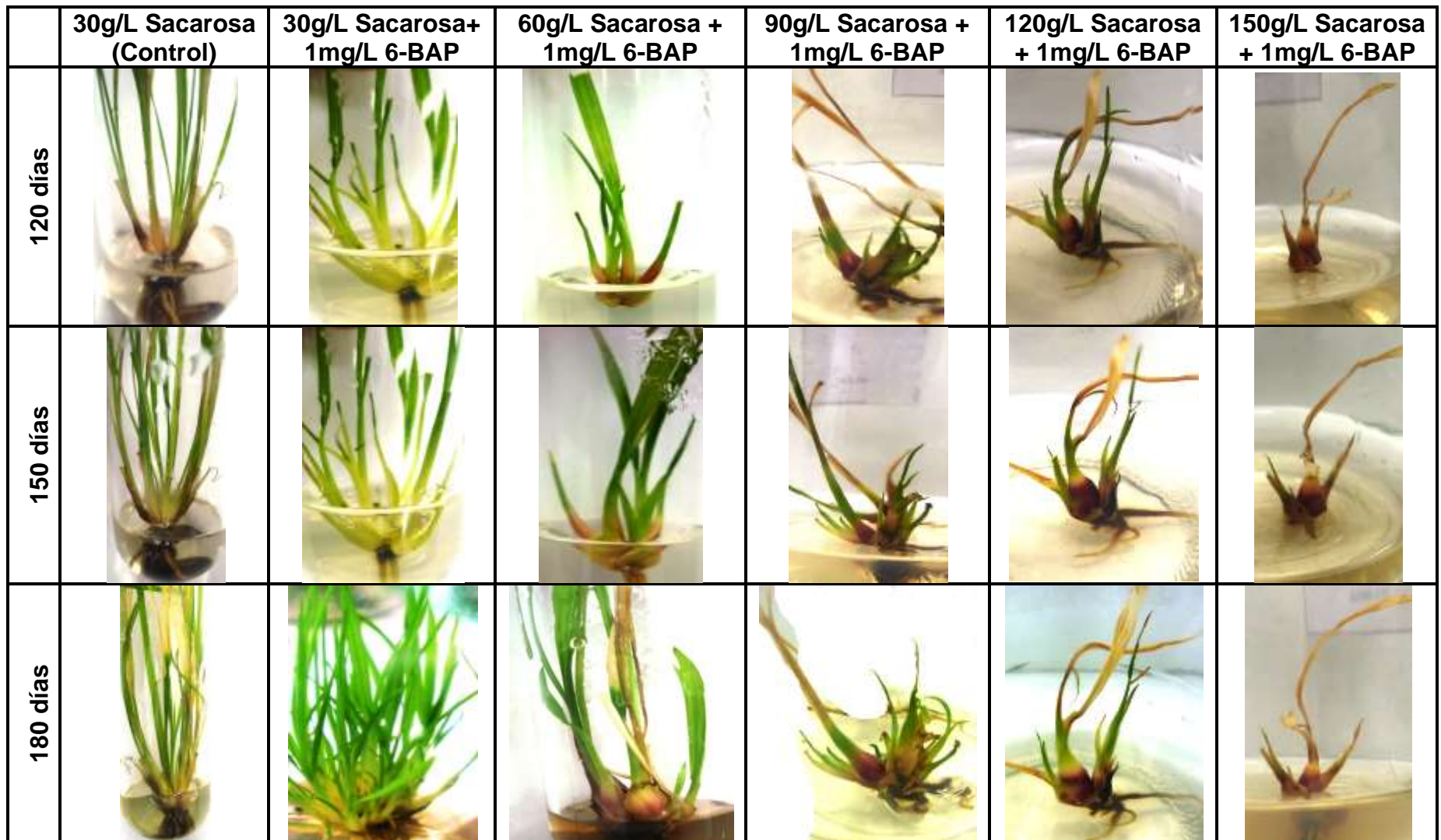


Figura 20. Plántulas *in vitro* en diferentes concentraciones de sacarosa (30, 60, 90, 120 y 150 g/L) y 6-BAP a los 120, 150 y 180 días de cultivo.

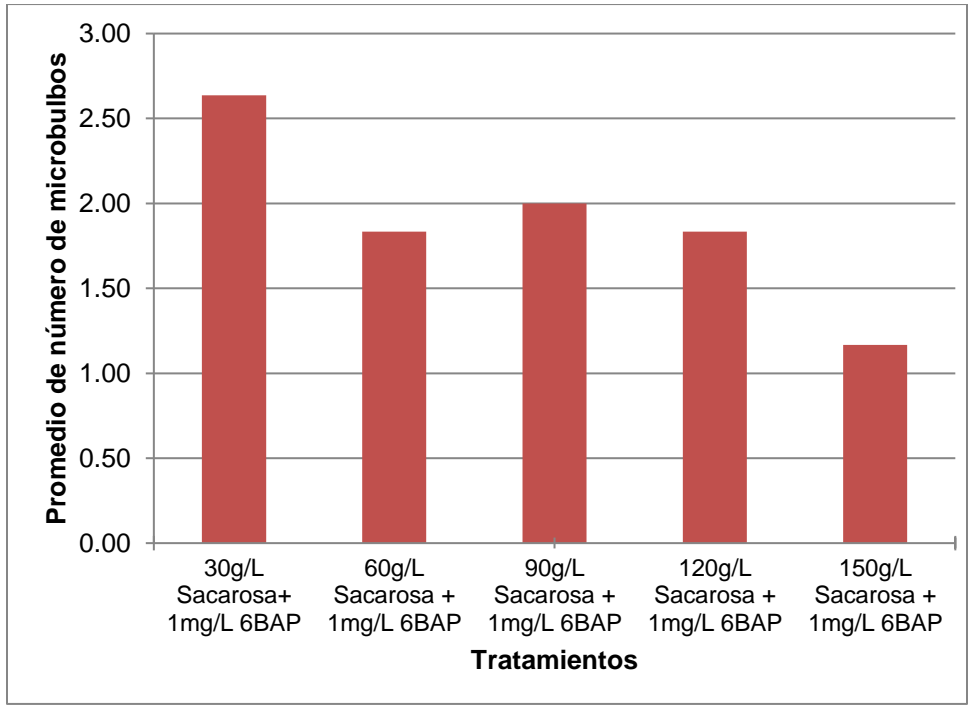


Figura 21. Influencia de la sacarosa y 6-BAP en la formación del número de microbulbos a los 30 días.

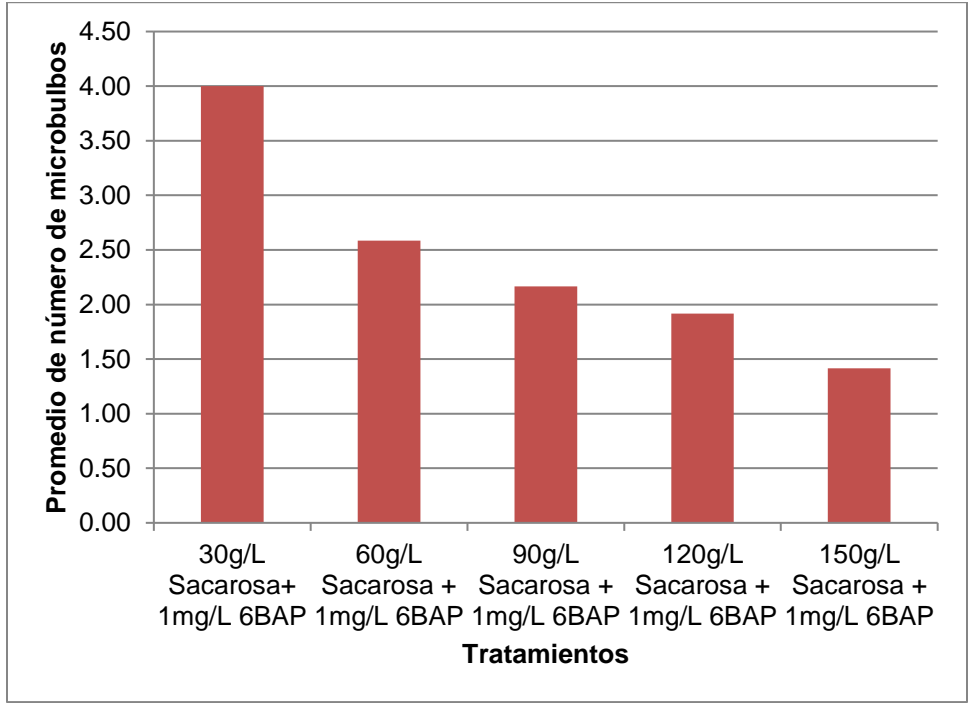


Figura 22. Influencia de la sacarosa y 6-BAP en la formación del número de microbulbos a los 60 días.

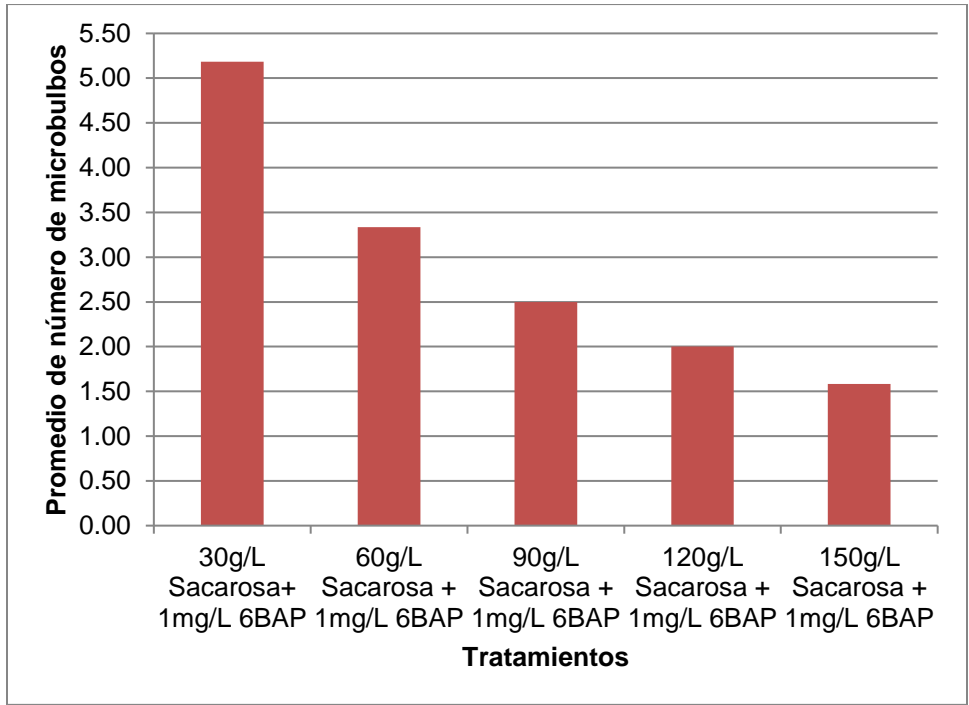


Figura 23. Influencia de la sacarosa y 6-BAP en la formación del número de microbulbos a los 90 días.

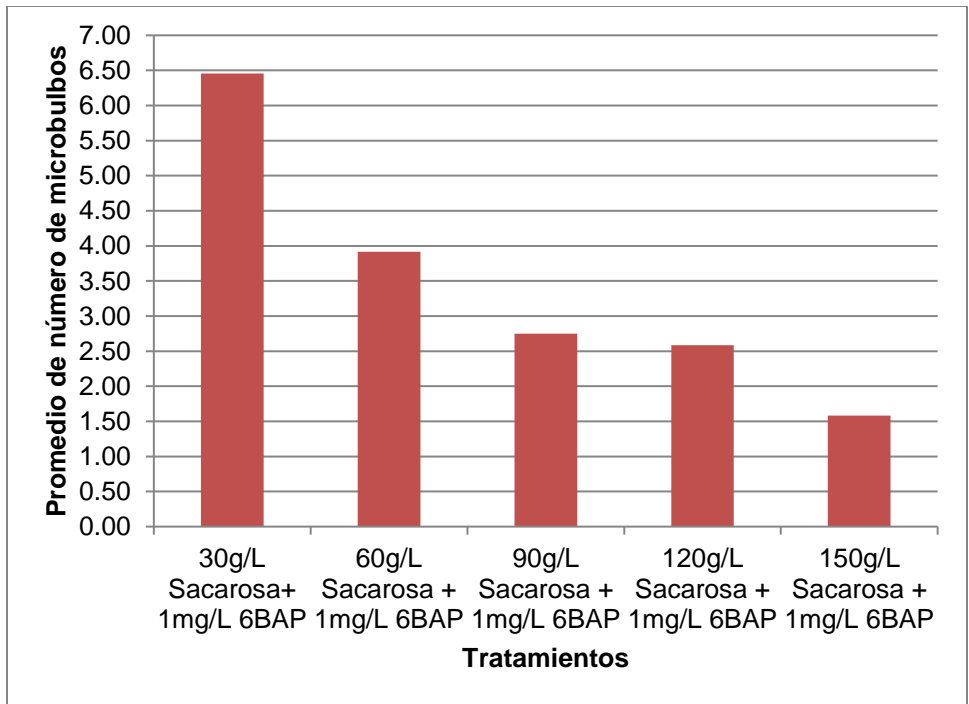


Figura 24. Influencia de la sacarosa y 6-BAP en la formación del número de microbulbos a los 120 días.

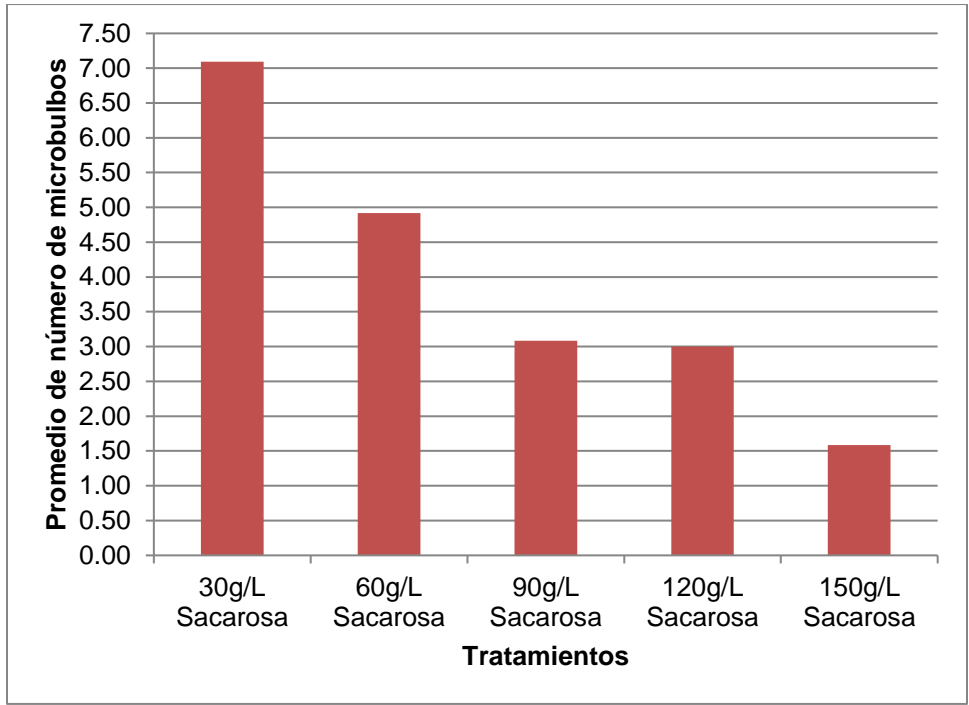


Figura 25. Influencia de la sacarosa y 6-BAP en la formación del número de microbulbos a los 150 días.

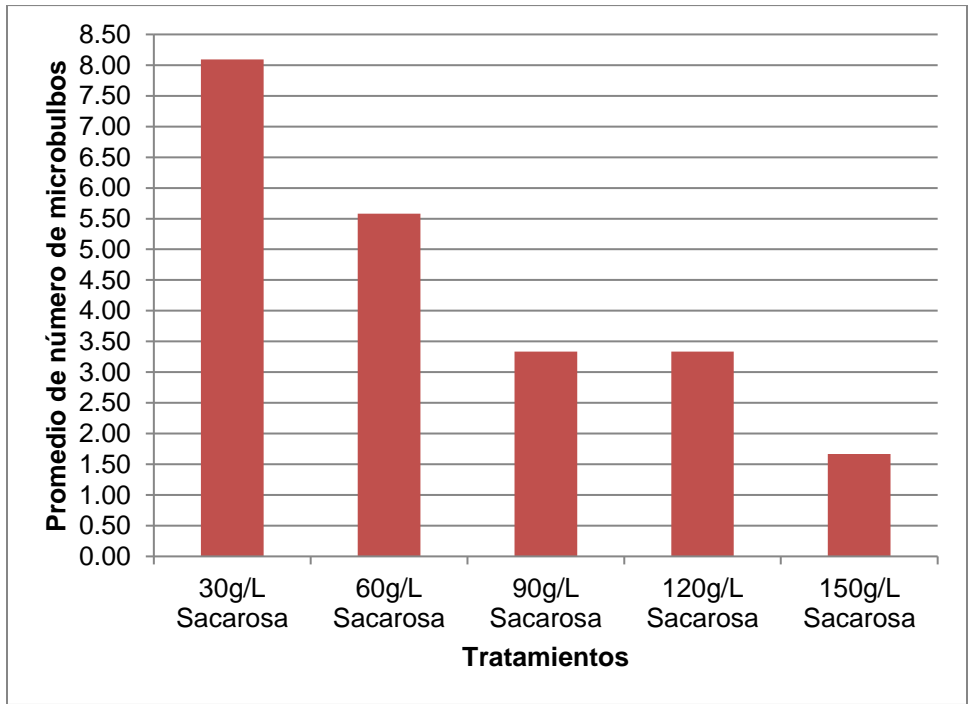


Figura 26. Influencia de la sacarosa y 6-BAP en la formación del número de microbulbos a los 180 días.

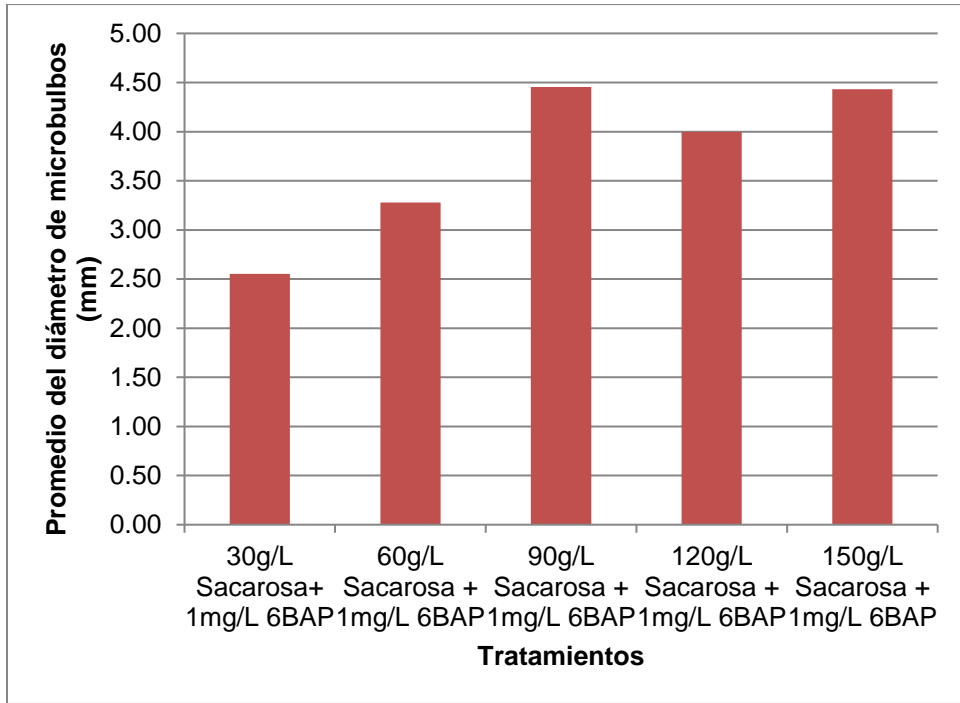


Figura 27. Influencia de la sacarosa y 6-BAP en el diámetro de los microbulbos a los 30 días.

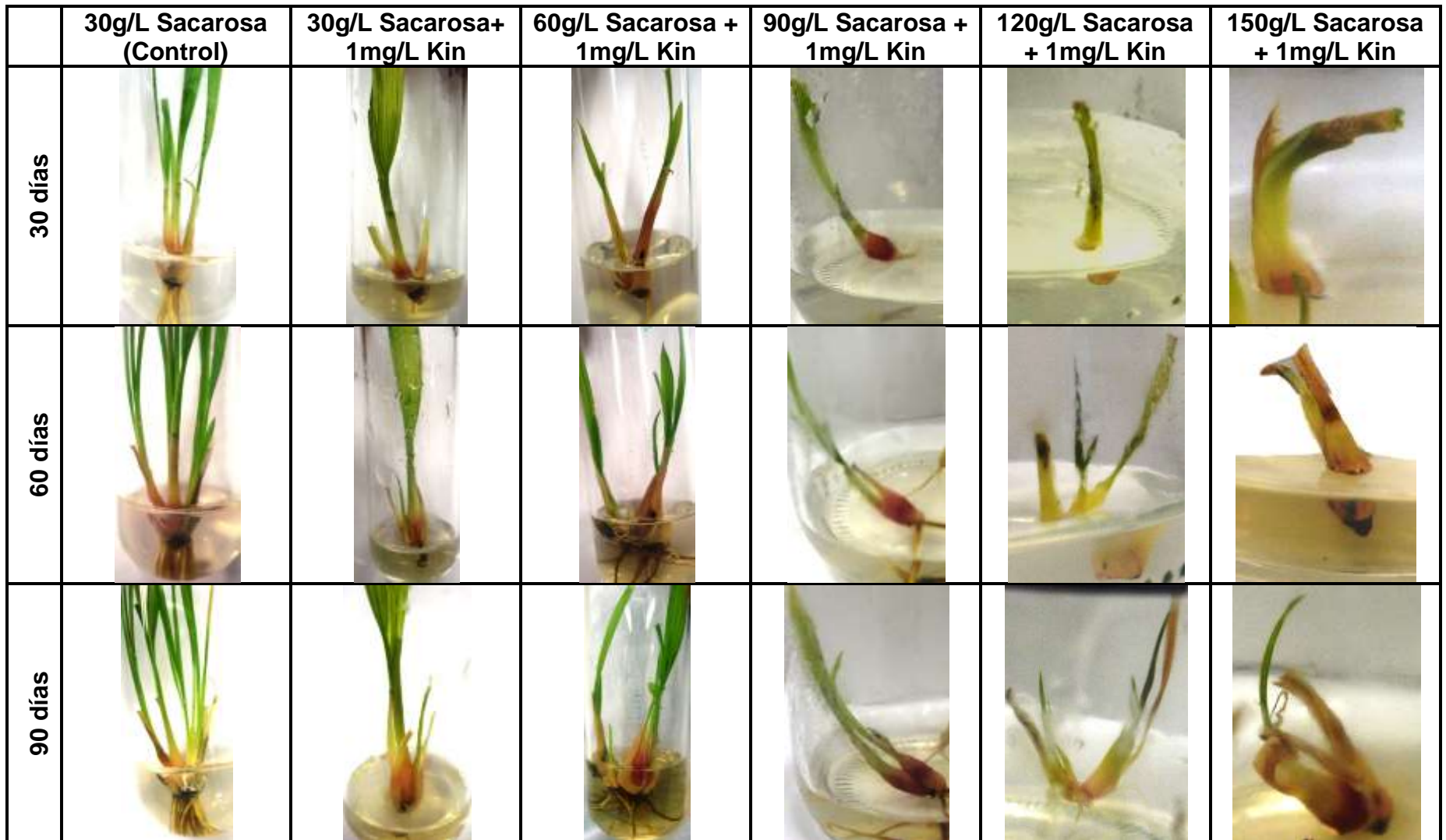


Figura 28. Plántulas *in vitro* en diferentes concentraciones de sacarosa (30, 60, 90, 120 y 150 g/L) y Kinetina a los 30, 60 y 90 días de cultivo.

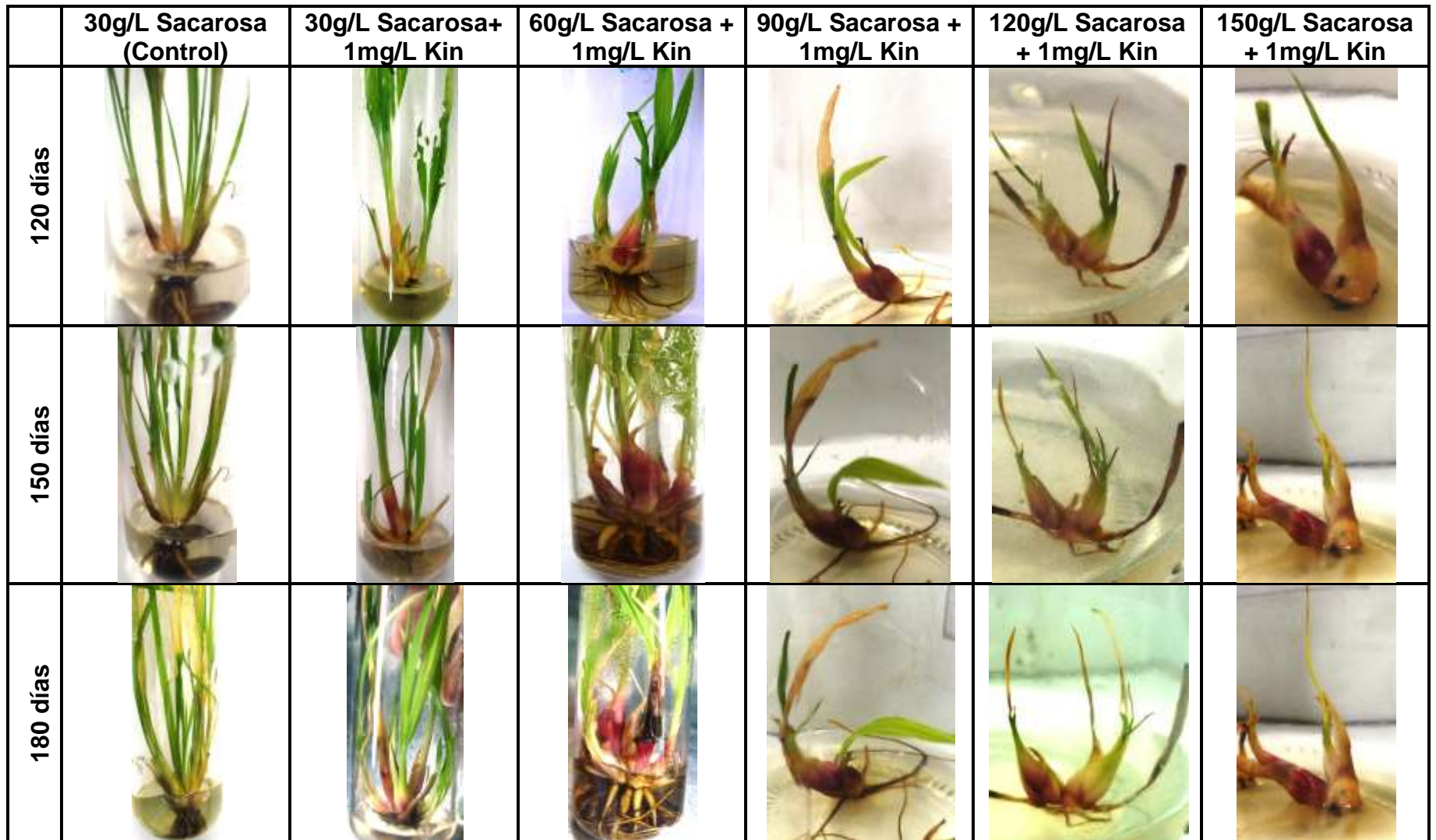


Figura 29. Plántulas *in vitro* en diferentes concentraciones de sacarosa (30, 60, 90, 120 y 150 g/L) y Kinetina a los 120, 150 y 180 días de cultivo.

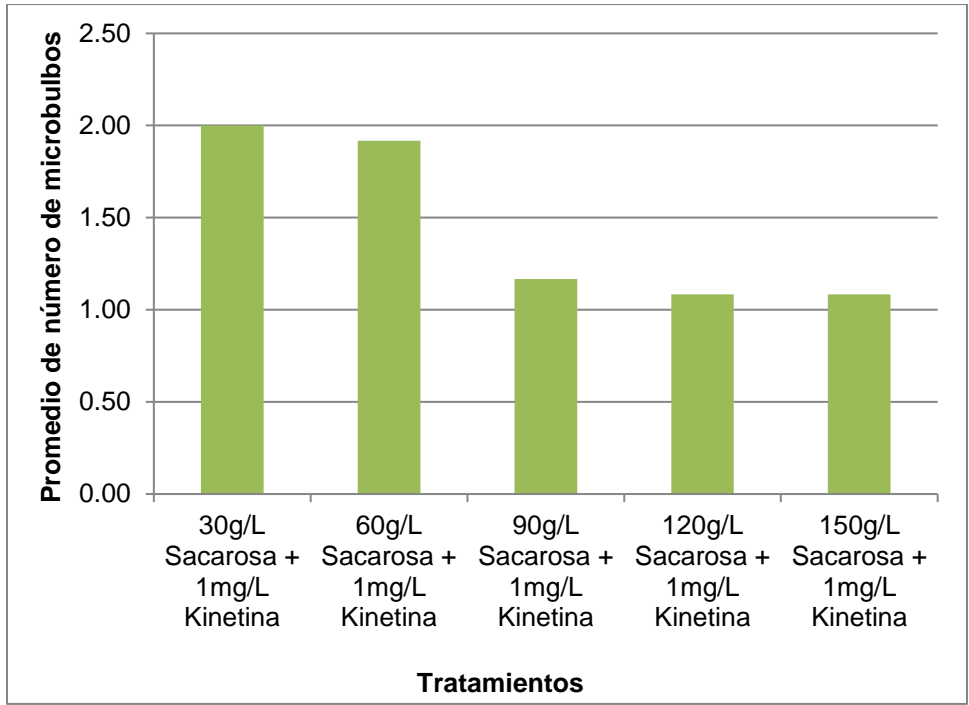


Figura 30. Influencia de la sacarosa y Kinetina en la formación del número de microbulbos a los 30 días.

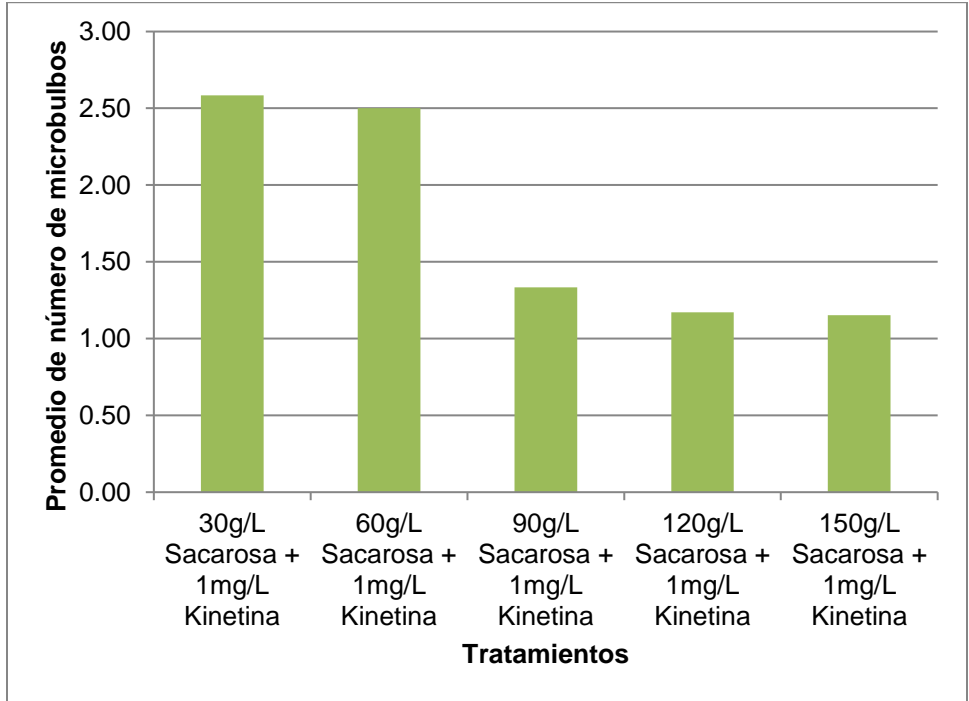


Figura 31. Influencia de la sacarosa y Kinetina en la formación del número de microbulbos a los 60 días.

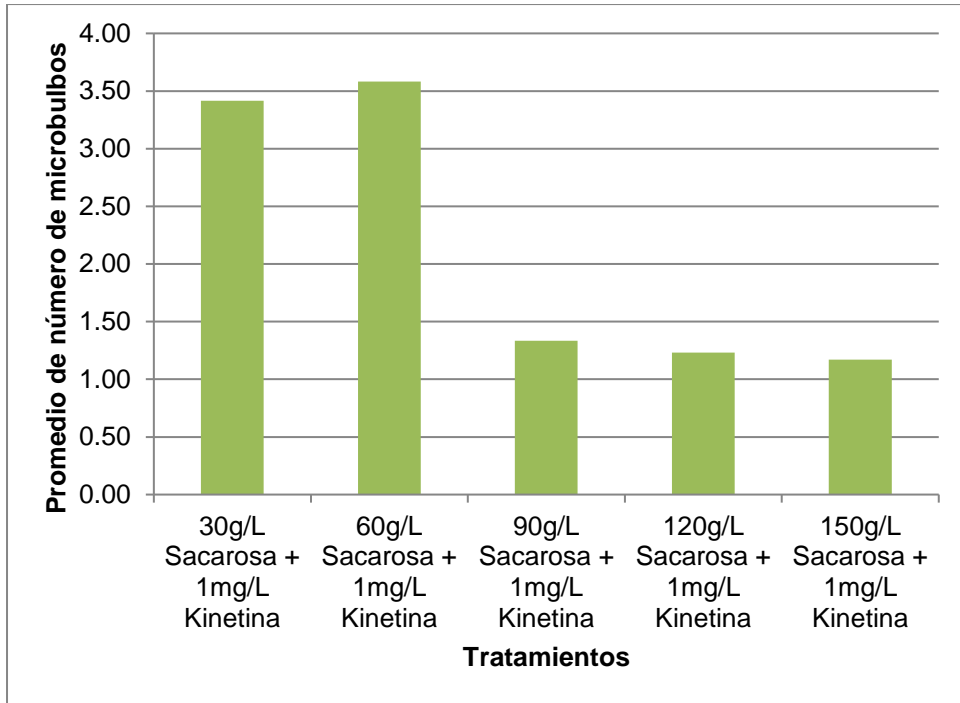


Figura 32. Influencia de la sacarosa y Kinetina en la formación del número de microbulbos a los 90 días.

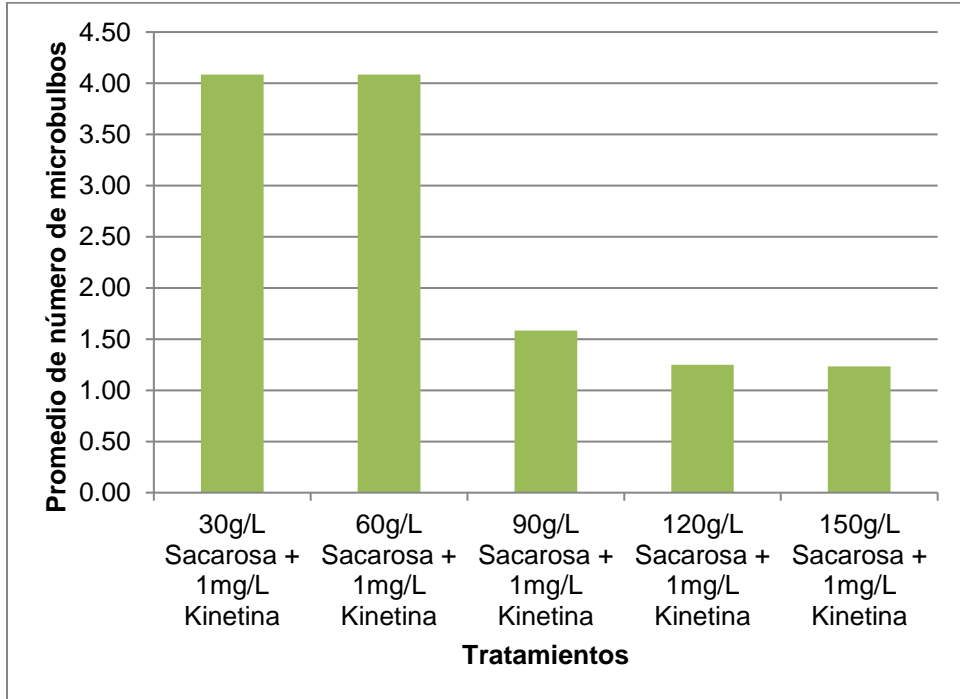


Figura 33. Influencia de la sacarosa y Kinetina en la formación del número de microbulbos a los 120 días.

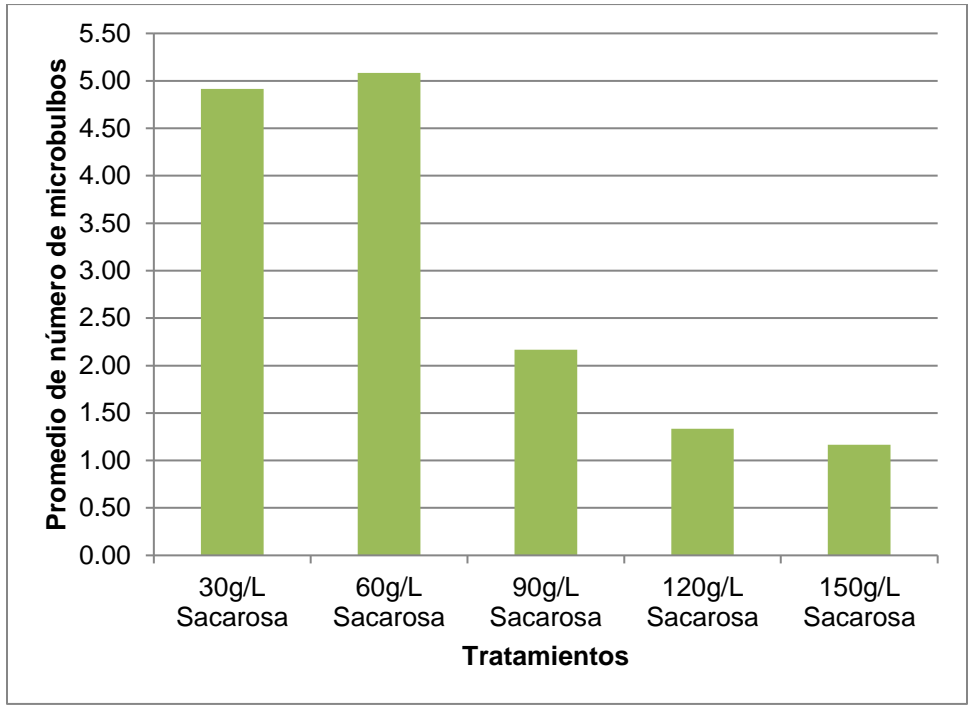


Figura 34. Influencia de la sacarosa y Kinetina en la formación del número de microbulbos a los 150 días.

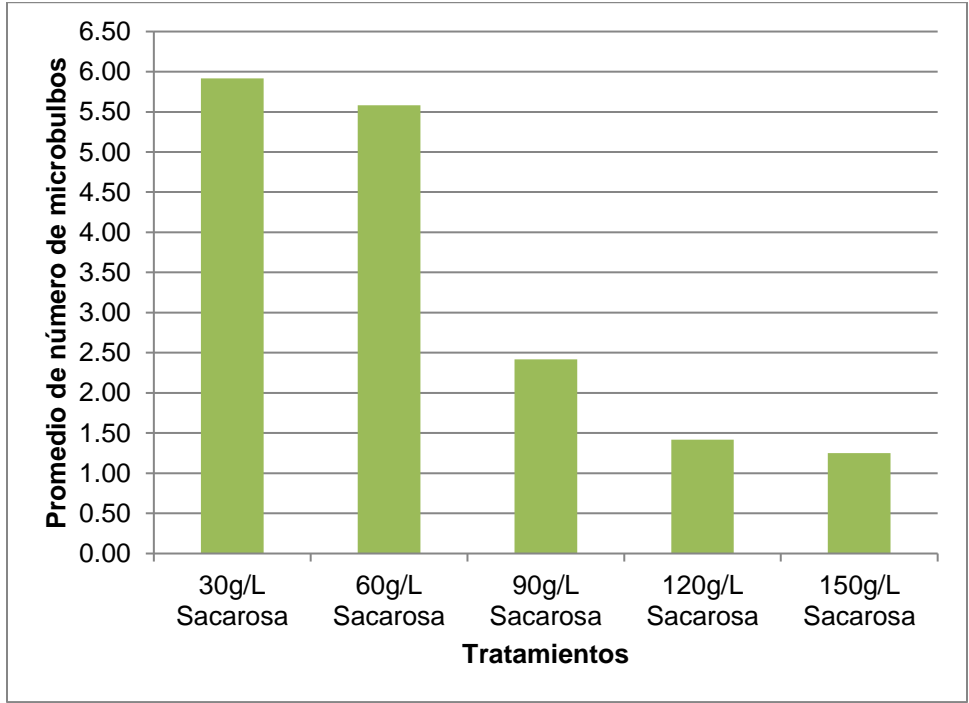


Figura 35. Influencia de la sacarosa y Kinetina en la formación del número de microbulbos a los 180 días.

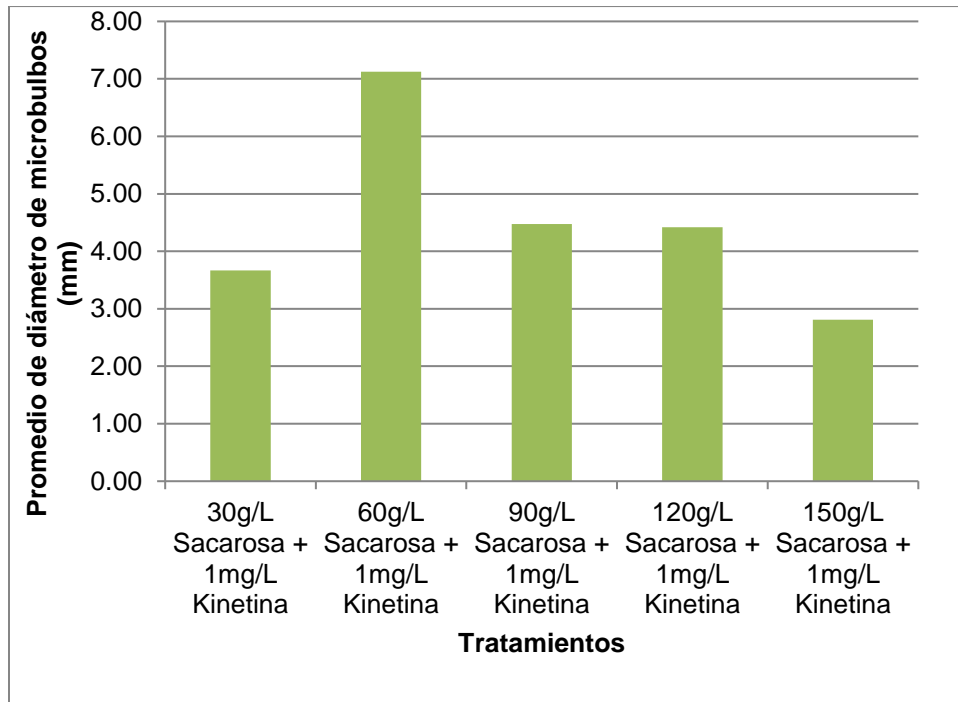


Figura 36. Influencia de la sacarosa y Kinetina en el diámetro de los microbulbos a los 180 días.







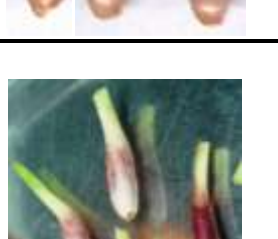


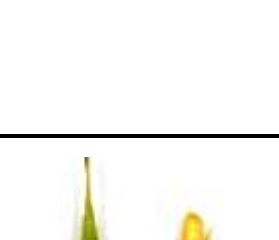
	-----	1mg/L 6-BAP	1mg/L Kin
30 μ /L Sacarosa			
60 μ /L Sacarosa			
90 μ /L Sacarosa			
120 μ /L Sacarosa			
150 μ /L Sacarosa			

Figura 37. Influencia de la sacarosa, Kinetina y 6-BAP en la formación de microbulbos.

9.2 Tablas

Tabla 1. Composición del medio Murashige-Skoog (1962).

Componentes	Concentración (mg/l)
Macroelementos	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Microelementos	
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.6
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025
Vitaminas	
Tiamina-HCl	0.1
Niacina	0.5
Glicina	2
Piridoxina-HCl	0.5
Mio-inositol	100
Quelato de hierro	
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27.8

Tabla 2. Diseño experimental para la determinación de la influencia de sacarosa, 6-BAP y Kinetina en la formación y obtención de microbulbos de *E. bulbosa*.

Tratamiento	*N	Composición del medio de cultivo
T1	12	MS + 30g/L Sacarosa (Control)
T2	12	MS + 60g/L Sacarosa
T3	12	MS + 90g/L Sacarosa
T4	12	MS + 120g/L Sacarosa
T5	12	MS + 150g/L Sacarosa
T6	12	MS + 30g/L Sacarosa + 1mg/L 6-BAP
T7	12	MS + 60g/L Sacarosa + 1mg/L 6-BAP
T8	12	MS + 90g/L Sacarosa + 1mg/L 6-BAP
T9	12	MS + 120g/L Sacarosa + 1mg/L 6-BAP
T10	12	MS + 150g/L Sacarosa + 1mg/L 6-BAP
T11	12	MS + 30g/L Sacarosa + 1mg/L Kinetina
T12	12	MS + 60g/L Sacarosa + 1mg/L Kinetina
T13	12	MS + 90g/L Sacarosa + 1mg/L Kinetina
T14	12	MS + 120g/L Sacarosa + 1mg/L Kinetina
T15	12	MS + 150g/L Sacarosa + 1mg/L Kinetina

*N: Número de repeticiones

Tabla 3. Influencia de la sacarosa en la formación del número de microbulbos durante 180 días de cultivo.

Tratamientos (composición del medio de cultivo)	Promedio de número de microbulbos* (promedio \pm error estándar)					
	30 días	60 días	90 días	120 días	150 días	180 días
T1: MS + 30g/L Sacarosa (Control)	2.40 \pm 0.27	3.50 \pm 0.43	4.50 \pm 0.54	5.00 \pm 0.67	5.60 \pm 0.72	6.20 \pm 0.84
T2: MS+ 60g/L Sacarosa	2.33 \pm 0.26	3.83 \pm 0.44	5.00 \pm 0.60	5.83 \pm 0.60	6.41 \pm 0.65	6.75 \pm 0.66
T3: MS + 90g/L Sacarosa	2.55 \pm 0.28	4.36 \pm 0.39	5.36 \pm 0.47	6.64 \pm 0.59	7.64 \pm 0.53	8.09 \pm 0.41
T4: MS + 120g/L Sacarosa	2.33 \pm 0.43	3.75 \pm 0.58	6.66 \pm 0.86	7.33 \pm 0.99	8.17 \pm 1.19	9.58 \pm 1.49
T5: MS + 150g/L Sacarosa	1.17 \pm 0.11	1.17 \pm 0.11	1.25 \pm 0.18	1.33 \pm 0.22	1.33 \pm 0.22	1.33 \pm 0.22

*Valores son significativamente diferentes (Test de Kruskal-Wallis, P=0.00). Cada valor representa el promedio de 12 repeticiones \pm error estándar.

Tabla 4. Influencia de la sacarosa y 6-BAP en la formación del número de microbulbos durante 180 días de cultivo.

Tratamientos (composición del medio de cultivo)	Promedio de número de microbulbos* (promedio ± error estándar)					
	30 días	60 días	90 días	120 días	150 días	180 días
T1: MS + 30g/L Sacarosa (Control)	2.40 ± 0.27	3.50 ± 0.43	4.50 ± 0.54	5.00 ± 0.67	5.60 ± 0.72	6.20 ± 0.84
T6: MS + 30g/L Sacarosa + 1mg/L 6-BAP	2.64 ± 0.28	4.00 ± 0.45	5.18 ± 0.63	6.45 ± 0.74	7.10 ± 0.71	8.09 ± 0.73
T7: MS+ 60g/L Sacarosa + 1mg/L 6-BAP	1.83 ± 0.11	2.58 ± 0.15	3.33 ± 0.14	3.92 ± 0.19	4.92 ± 0.15	5.58 ± 0.23
T8: MS + 90g/L Sacarosa + 1mg/L 6-BAP	2.00 ± 0.17	2.17 ± 0.24	2.50 ± 0.31	2.75 ± 0.30	3.10 ± 0.31	3.33 ± 0.38
T9: MS + 120g/L Sacarosa + 1mg/L 6-BAP	1.83 ± 0.11	1.92 ± 0.15	2.00 ± 0.12	2.58 ± 0.19	3.00 ± 0.17	3.33 ± 0.19
T10: MS + 150g/L Sacarosa + 1mg/L 6-BAP	1.17 ± 0.11	1.42 ± 0.23	1.58 ± 0.23	1.58 ± 0.23	1.58 ± 0.23	1.66 ± 0.22

*Valores son significativamente diferentes (Test de Kruskal-Wallis, P=0.00). Cada valor representa el promedio de 12 repeticiones ± error estándar.

**6-BAP: 6 Bencilaminopurina.

Tabla 5. Influencia de la sacarosa y Kinetina en la formación del número de microbulbos durante 180 días de cultivo.

Tratamientos** (composición del medio de cultivo)	Promedio de número de microbulbos* (promedio ± error estándar)					
	30 días	60 días	90 días	120 días	150 días	180 días
T1: MS + 30g/L Sacarosa (Control)	2.40 ± 0.27	3.50 ± 0.43	4.50 ± 0.54	5.00 ± 0.67	5.60 ± 0.72	6.20 ± 0.84
T11: MS + 30g/L Sacarosa + 1mg/L Kin	2.00 ± 0.12	2.58 ± 0.15	3.42 ± 0.19	4.08 ± 0.23	4.92 ± 0.15	5.92 ± 0.19
T12: MS+ 60g/L Sacarosa + 1mg/L Kin	1.92 ± 0.15	2.50 ± 0.23	3.58 ± 0.43	4.08 ± 0.41	5.10 ± 0.53	5.58 ± 0.69
T13: MS + 90g/L Sacarosa + 1mg/L Kin	1.17 ± 0.11	1.33 ± 0.19	1.33 ± 0.18	1.58 ± 0.42	2.17 ± 0.24	2.42 ± 0.26
T14: MS + 120g/L Sacarosa + 1mg/L Kin	1.10 ± 0.83	1.17 ± 0.11	1.23 ± 0.15	1.25 ± 0.18	1.33 ± 0.19	1.42 ± 0.19
T15: MS + 150g/L Sacarosa + 1mg/L Kin	1.10 ± 0.83	1.15 ± 0.45	1.17 ± 0.11	1.23 ± 0.15	1.23 ± 0.15	1.25 ± 0.13

*Valores son significativamente diferentes (Test de Kruskal-Wallis, P=0.00). Cada valor representa el promedio de 12 repeticiones ± error estándar.

**Kin: Kinetina

Tabla 6. Influencia de la sacarosa, 6-BAP y Kinetina en la formación del número de microbulbos a los 180 días de cultivo.

Fitorreguladores*		Diámetro de microbulbos (mm)**				
		Concentración de sacarosa (g/L)				
6 - BAP	Kinetina	30	60	90	120	150
-	-	2.55 ± 0.12 (62)	3.24 ± 0.08 (81)	3.40 ± 0.07 (93)	3.47 ± 0.08 (108)	2.37 ± 0.11 (16)
+	-	2.45 ± 0.10 (89)	3.28 ± 0.11 (71)	4.45 ± 0.15 (40)	4.00 ± 0.14 (40)	4.43 ± 0.21 (20)
-	+	3.67 ± 0.10 (67)	7.12 ± 0.15 (67)	4.47 ± 0.16 (29)	4.42 ± 0.19 (17)	2.81 ± 0.13 (15)

*Se utilizó medio Murashige-Skoog (MS) y una concentración de fitoreguladores(6-BAP y Kinetina) de 1mg/L.

**Valores son significativamente diferentes (Test de Kruskal-Wallis, P=0.00). * Cada valor representa el promedio del diámetro de microbulbos por cada tratamiento ± error estándar y, entre paréntesis, el número de microbulbos obtenidos por cada tratamiento.